



HAL
open science

Potentiel adaptatif des espèces fusariennes toxigènes (*Fusarium* spp.) face aux changements climatiques : représentativité, écophysiologie et interactions

Marie-Anne Garcia

► To cite this version:

Marie-Anne Garcia. Potentiel adaptatif des espèces fusariennes toxigènes (*Fusarium* spp.) face aux changements climatiques : représentativité, écophysiologie et interactions. Génétique. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0261 . tel-04950935

HAL Id: tel-04950935

<https://theses.hal.science/tel-04950935v1>

Submitted on 17 Feb 2025

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEURE DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé
SPÉCIALITÉ Génétique

Par Marie-Anne GARCIA

**Potentiel adaptatif des espèces fusariennes toxigènes
(*Fusarium spp.*) face aux changements climatiques :
représentativité, écophysiologie et interactions**

Sous la direction de : Marie FOULONGNE-ORIOU

Soutenue le 15/11/2024

Membres du jury :

M. Gaétan LE FLOCH, Professeur des universités, ESIAB (PLOUZANE), Rapporteur
M. Matias PASQUALI, Associate Professor, Université de Milan (Milan, ITALIE), Rapporteur
Mme Marie FOULONGNE-ORIOU, Chargée de recherche, INRAE (Villenave d'Ornon), Directrice de thèse
Mme Anne-Lise BOIXEL, Ingénieure de recherche, Université Paris-Saclay (Palaiseau), Examinatrice
Mme Cécile ROBIN, Directrice de recherche, INRAE (Cestas), Examinatrice
M. Michel HERNOULD, Professeur, Université de Bordeaux (Talence), Examinateur

Remerciements

Je vais profiter de ces quelques lignes pour remercier les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont accompagnée durant ces trois années.

Tout d'abord, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à tous les membres du jury pour avoir évalué mes travaux de thèse. J'espère que cette lecture sera agréable et enrichissante.

Je tiens à remercier tous mes collègues de la PGTB. Erwan, Zoé, Adline, Christophe, merci pour votre disponibilité et votre accueil chaleureux à chacune de mes visites. Je remercie également Agathe, Angélique et Romain pour le travail réalisé ensemble et pour votre aide dès que j'en ai eu besoin.

Un peu d'exotisme amené par les prochaines personnes à qui j'adresse mes remerciements : mes collègues et amis mexicains qui ont fait de mon séjour au Mexique l'un des plus beaux moments de ma vie. Toño, Juan, Mirna, Angie, Caro, Erika, Liliana, Alejandra, vous m'avez accueillie chaleureusement, comme un membre de votre famille et je vous en suis très reconnaissante. Ce voyage m'a changée et je m'attache vraiment à garder en moi un peu de votre culture mexicaine qui est incroyable. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Marie-Odile, Pierre, un immense merci à vous. Travailler à vos côtés a été une expérience très enrichissante et m'a confirmé que la collaboration est indispensable dans notre domaine. Vous avez été d'un réel soutien pour moi, spécialement dans cette dernière année de thèse et je vous en remercie encore.

Rémi, tu es le roi des stat à mes yeux ! Je tiens à te remercier pour tous ces échanges scientifiques, travailler avec toi c'était vraiment top. Tu as toujours réussi à me raccrocher aux wagons des stat, pourtant on partait de très, très loin... Merci pour tout le temps que tu m'as accordé, pour ta patience, pour ta formation express à R. Et surtout, merci pour ton amitié, tes conseils, ton humour qui ont fait de chacun de tes passages à Bordeaux des moments que je chéris.

Je tiens à remercier tous mes collègues de MycSA, qui ont fait qu'aucun jour ne se ressemblait sur ces trois dernières années. La vie à MycSA est mouvementée, avec ses crises existentielles... mais surtout avec toutes ces personnes au grand cœur.

Juliette, je te considère vraiment comme le petit rayon de soleil de MycSA, la dernière arrivée et tu as mis tout le monde d'accord avec ta joie de vivre et ta bonne humeur au quotidien, merci pour ça !

Vessela, un grand merci à toi pour ton soutien dès la première heure du matin.

Anne, merci pour toutes tes anecdotes, les conversations sont toujours animées avec toi !

Jean-Michel, merci pour votre amabilité et un grand merci pour cette opportunité d'être allée travailler quelques temps au Mexique.

Marie-No, ton énergie quotidienne m'épatera toujours !

Nathalie, Magalie, un grand merci à vous deux. Travailler sur le projet Evoltox c'était... démesuré ! Ces heures passées avec vous à inoculer, arrêter des cultures, extraire des toxines, sans jamais en voir la fin ! Vous êtes des personnes de confiance, merci pour votre travail. Mais surtout un grand merci pour tous ces moments en votre compagnie.

Christine, tu as ton petit caractère bien à toi et c'est ça qui fait de toi une personne exceptionnelle, indépendante et qui aime profiter de la vie ! J'espère de tout cœur que tu t'épanouiras dans ta nouvelle vie et qu'on se recroisera au Pays-Basque, la plus belle région de France !

Nadia, un grand merci pour nos conversations sur la vie !

Laetitia, merci de m'avoir accompagnée dans mon travail et d'avoir répondu présente dès que j'en avais besoin. Merci aussi pour les litres de thé partagés ensemble après 17 h ! Et merci d'avoir lu mon avenir dans les osselets pile au moment où j'avais besoin qu'on me donne une bonne nouvelle....

Merci à tous les doctorants, stagiaires et collègues de passage qui font que MycSA trouve son équilibre : Nils (tu es d'ailleurs plus un collègue permanent que de passage maintenant), Linda, Tran, Barbara. Oriane et Aurélie, merci pour votre soutien infailible sur ces derniers mois de travail, et merci pour les peluches et surtout les cookies ! Valentin, Marine, Karen, Elise, Aurélie (encore) force et courage à vous pour la suite.

Stéphane, un grand merci pour ton aide dans mes travaux et tous les créneaux que tu as libéré sur la masse, qu'on a clairement fait chauffer ! Merci pour ton humour au

quotidien, les moments en ta compagnie ont toujours été drôles mais aussi sérieux quand il le fallait. Merci pour tous tes conseils et pour m'avoir souvent aidée à dédramatiser.

Maïder, je ne sais pas par où commencer. Déjà, merci pour ton aide dans mes travaux, sans toi je serais encore en train de m'arracher les cheveux sur cette base de données ! Dès que tu es arrivée à MycSA j'ai su que tu étais une personne géniale et que tu allais apporter un peu de peps à l'équipe. Ton humour, ta joie de vivre, ton énergie, que de compliments, mais je le pense vraiment ! Tu as été un soutien au quotidien pour moi, merci.

Louis, merci pour toutes ces conversations scientifiques, pour tous tes conseils, pour ton soutien et surtout pour ton expertise ! J'ai vraiment énormément de respect pour le scientifique que tu es ! Merci aussi de m'avoir ouvert la porte de ton bureau pour cette dernière année de thèse, même si tu n'as pas cédé ta place à côté du chauffage... Merci pour ton humour décalé que j'adore, pour tes jeux de mots qui sortent de nulle part, merci pour tout !

Florence, je vous adresse mille mercis. Vous êtes une personne que j'admire, professionnellement et humainement et pour qui j'ai énormément de respect. Vous êtes ouverte à toutes les idées, vous avez toujours de bons conseils et vous êtes d'une gentillesse exemplaire, ce qui me paraît indispensable pour être la directrice d'unité à MycSA (il faut un peu de courage aussi quand même...) ! Merci de m'avoir prise sous votre aile quand j'en ai eu besoin et de m'avoir un peu bousculée aussi, quand il le fallait ! Vous avez été d'un soutien et d'une aide infaillibles. Merci aussi pour tous nos moments partagés, pour nos conversations, sur tout et n'importe quoi autour d'un café ou d'un thé.

Marie, nous y voilà, 6 mois de stage et 3 ans de thèse à résumer en quelques lignes. Je te remercie de m'avoir offert ces opportunités d'avancer dans ma carrière professionnelle. Tu as forgé la scientifique que je suis aujourd'hui et je garderai toujours une petite part de toi en moi (surtout la part qui me dit de me faire confiance !). Merci pour ta patience et pour la confiance que tu m'as accordée, mais surtout merci pour ton amitié et ton soutien moral au quotidien, au détour d'une plus ou moins longue discussion dans le bureau !

Mes prochains remerciements s'adressent à mes ami(e)s, de plus ou moins longue date, avec qui je partage des moments géniaux et surtout des fous rires, qui sont

indispensables dans mon quotidien : Antoine, Ghislain, Matthieu, Pierre, Armand, Lucy Camille, Juju.

Merci à la team Bad, sans qui mon niveau serait encore proche de la nullité ! Merci pour tous ces moments de fous rires que j'attends avec impatience chaque lundi.

Merci à la team des anciens doctorants, pour ne pas dire vieux : Aurélie, Antoine, Valentin et Jean-Marie. Je chéris tous les moments passés en votre compagnie, au labo ou autour d'un verre. Je me faisais une idée plutôt utopique du lien qui se crée entre les doctorants. Mais avec vous, c'est devenu réel ! Antoine, un petit remerciement tout spécialement pour toi, merci pour le soutien que tu m'as apporté ces dernières semaines.

Jessica, ma grande sœur d'Argentine, tu m'as apporté tout le réconfort dont j'avais besoin cette dernière année. Entre notre amour pour la danse, la fête, le soleil et les mojitos, notre amitié était évidente !

Maxime, le meilleur technicien que je connaisse, un grand merci à toi pour tout le travail de qualité que tu as fourni à mes côtés. Merci pour tous ces moments de partage et de rigolade. Tu m'as été d'un grand soutien moral sur cette dernière année, je t'en remercie énormément.

Emmie, Maé, des remerciements ne suffisent pas à expliquer tout ce que je vous dois. Merci pour tous ces week-ends bordelais, toujours festifs et pleins de péripéties. Merci pour votre soutien au quotidien et de toujours être là quand j'en ai besoin.

Delphine, Mathisse, bientôt 10 ans d'amitié, aïe... ça passe ! Merci de toujours répondre présentes quand il est question de rigoler, de se soutenir, de papoter. Notre amitié est vraiment sincère et c'est quelque chose de précieux pour moi.

Toutes les quatre, vous êtes ma plus belle relation !

Enfin, un grand merci à Audrey, Coco, Annick et Éric, pour votre soutien sans faille et vos encouragements.

Et puis merci à ma famille, de vivre avec moi tous les moments importants de ma vie, comme aujourd'hui ! Maman, je sais que tu es fière de tout ce qu'on réalise avec mes sœurs et c'est en grande partie grâce à toi, à l'amour que tu nous as toujours donné. Merci d'avoir toujours cru en nous et de nous avoir poussées à donner le meilleur de nous-même. Maddy, Anne-Lise, merci d'avoir toujours pris soin de moi, de m'avoir soutenue au quotidien, de m'avoir montré que vous êtes fières de moi. Merci aussi d'avoir fait entrer dans ma vie mes deux (vieux) beaux-frères, sans qui on s'ennuierait

un peu ! Fabien, Victor, merci pour votre joie de vivre au quotidien et pour toutes vos blagues, même si je ne suis pas sûre de vouloir vous remercier pour ça... Et puis merci d'alimenter le groupe de la famille avec les exploits quotidiens de Léna, Eva et Gabi, sans quoi les journées seraient tristes ! Merci à vous tous pour votre amour.

Pour terminer, je tiens à remercier du fond du cœur mon Joris, avec qui je partage ma vie depuis 5 ans maintenant, suite à la plus belle des rencontres ! Je te remercie pour l'épanouissement que tu m'apportes au quotidien, par ton humour, ta folie et ton amour. Tu rends ma vie Rock 'n' roll ! Merci de m'avoir supportée, dans les deux sens du terme, dans cette aventure qu'est la thèse. Merci d'avoir été là, jour et nuit, pour me rassurer, m'écouter, me motiver, et me faire rire. Je te le dis souvent, tu es mon équilibre !

« In an isolated system, entropy can only increase »
Isolated System, The 2nd Law, Muse

Table des matières

Publications scientifiques	1
Communications scientifiques	1
1. Communications orales	1
2. Poster	1
Abréviations.....	2
Liste des Figures et Tableaux.....	3

Préambule : les enjeux liés à l'étude	9
1. L'enjeu de la sécurité alimentaire	9
2. L'enjeu du changement climatique	10

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La fusariose de l'épi de blé et ses agents pathogènes	15
1. L'importance des céréales dans le système alimentaire.....	15
2. La fusariose de l'épi de blé : origine, symptômes et moyens de lutte	17
3. Les espèces fongiques responsables de la FHB	19
Les espèces toxigènes du genre <i>Fusarium spp.</i>	22
1. Le cycle de vie et de reproduction de <i>F. graminearum</i>	22
2. Les mycotoxines produites par <i>Fusarium spp.</i>	24
Distribution des espèces fusariennes et les changements environnementaux.....	29
1. Occurrence des espèces de <i>Fusarium</i> au champ.....	29
2. Écophysiologie des espèces de <i>Fusarium</i>	31
3. Écophysiologie des espèces de <i>Fusarium</i> en interaction	34
Projet de thèse	36

CHAPITRE 1 : ÉVOLUTION DE LA DISTRIBUTION DES ESPÈCES FUSARIENNES INFECTANT LE BLÉ ENTRE 2007 ET 2022

Objectifs du chapitre 1	40
Introduction	41
1. Principe général du metabarcoding	41
2. Le metabarcoding chez <i>Fusarium</i>	44
Matériel et méthodes	46
1. Échantillons fongiques.....	46
2. Méthodes pour l'étude des mycotoxines.....	47
3. Méthodes pour l'étude des communautés fusariennes.....	47
4. Analyses statistiques	50
Mise au point de la méthode	51
1. Transférabilité de l'outil et méthode d'analyse	51
2. Validation de la méthode en interne	52
2.1. Reproductibilité de la méthode entre les différents runs de séquençage...52	
2.2. Reproductibilité de la méthode entre différents laboratoires.....55	
2.3. Mise au point des assignations au rang de l'espèce de <i>Fusarium</i>56	
Résultats et discussion	59
1. Qualité du jeu de données de metabarcoding	59
2. Analyse de la diversité des espèces de <i>Fusarium</i> et des profils de mycotoxines associées	60

2.1. Espèces fusariennes majoritaires et corrélations.....	60
2.2. Mycotoxines majoritaires et corrélations.....	64
3. Occurrence des espèces fusariennes prédominantes en fonction des mycotoxines quantifiées	67
4. Distribution temporelle des espèces fusariennes et des profils de mycotoxines associées	68
4.1. Distribution temporelle des espèces fusariennes.....	68
4.2. Distribution temporelle des profils de mycotoxines.....	71
5. Analyse de l'effet de facteurs climatiques sur la distribution des profils de mycotoxines	73
5.1. Présentation des données climatiques.....	73
5.2. Effet de la température et des précipitations sur les profils de mycotoxines associés aux espèces fusariennes.....	75
Conclusions et perspectives du chapitre 1	77

CHAPITRE 2 : ÉCOPHYSIOLOGIE DES ESPÈCES FUSARIENNES EN CULTURES IN VITRO

Objectifs du chapitre 2.....	81
------------------------------	----

PARTIE 1 : Écophysiologie des espèces de Fusarium en monocultures

Introduction.....	86
Results.....	88
Influence of environmental conditions on growth.....	88
Frequency of growth and growth parameters in response to a_w and Θ factors.....	88
Probability of growth : species exhibit contrasted responses to a_w and Θ factors.....	90
Growth parameters of species are differentially driven by $a_w \times \Theta$ conditions.....	91
Interspecific diversity has only a slight effect on growth parameters, compared to environmental factors.....	93
Intraspecific diversity affects more growth parameters than interspecific diversity	95
Intraspecific effect is different between species.....	96
Influence of environmental conditions on mycotoxin production.....	98
The capacity of species to produce mycotoxin is differentially impacted by a_w and Θ factors.....	98
Probability of mycotoxin production according to environmental factors and species.....	101
Correlation between environmental conditions, mycotoxins and growth parameters.....	102
Discussion.....	104
Optimising analyses to fully exploit relevant biological data.....	104
Differential responses of fusarium species under fluctuating environmental conditions.....	105
Exploring intraspecific diversity of fusarium species.....	106
Beyond ecophysiology of fusarium species: anticipate their future distribution under climate change.....	107
Conclusions.....	108
Materials and methods	108
Growth and mycotoxin production.....	108
Strain collection.....	108

Culture media.....	108
Spore production.....	109
Inoculation and study of fungal growth.....	109
Study of mycotoxin production.....	109
Mycotoxins analysis	110
Data analysis	111
Estimation of the absorption of the plates.....	111
Fitting of the growth curves.....	111
Modelling the probability of growth.....	112
Variance partitioning analysis.....	112
Modelling the probability of mycotoxin production.....	113
Effect of environmental conditions on the mycotoxin production.....	113
Correlations between mycotoxins production and growth parameters.....	114
References.....	115
Supplementary files.....	121
Résumé des conclusions	130

PARTIE 2 : Écophysiologie des espèces de Fusarium en cocultures

Introduction.....	133
-------------------	-----

PARTIE 2.1 : Croissance et production de mycotoxines au sein des cocultures

Objectifs.....	137
Matériels et méthodes	138
1. Préparation des échantillons fongiques	138
2. Méthodes pour l'analyse de la croissance fongique	139
3. Méthodes pour l'analyse des mycotoxines	140
4. Analyses statistiques	140
Résultats et discussion	141
1. Observation de la croissance fongique.....	141
2. Étude du développement fongique dans les cocultures en réponse à des variations environnementales.....	141
2.1. Présentation des données de quantification d'ADN.....	141
2.2. Étude de la diversité intraspécifique chez <i>F. graminearum</i>	142
2.3. Étude de l'effet des facteurs environnementaux.....	142
3. Étude de la production de mycotoxine dans les cocultures en réponse à des variations environnementales.....	144
3.1. Présentation des données : présence / absence des mycotoxines.....	144
3.2. Effet des facteurs environnementaux sur la production de mycotoxines par <i>F. graminearum</i> et <i>F. avenaceum</i> en coculture.....	145
3.3. Effet des facteurs environnementaux sur la production de mycotoxines par <i>F. graminearum</i> et <i>F. poae</i> en coculture.....	147
4. Relations entre les quantités d'ADN et de mycotoxines dans les cocultures	149
Résumé des conclusions	150

PARTIE 2.2 : Étude du profil métabolomique de *F. graminearum* et *F. poae* en coculture, sous contrainte thermique

Objectifs.....	153
Matériels et Méthodes	154
1. Préparation des échantillons fongiques	154
2. Méthodes pour l'analyse de la croissance fongique	155
3. Méthodes pour l'analyse des mycotoxines	156
4. Analyses statistiques	157
Résultats et discussion	158
1. Croissance de la coculture.....	158
2. Profils métabolomiques à 25 °C.....	159
3. Profils métabolomiques à 30 °C.....	161
4. Comparaison des profils métabolomiques des monocultures et de la coculture à 25 °C et 30 °C	163
Résumé des conclusions	165
Conclusions et perspectives du chapitre 2	166

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Bilan des travaux de thèse	171
Exploiter d'autres paramètres de l'agrosystème pour mieux comprendre les distributions fusariennes	174
1. Étudier la localisation.....	174
2. Étudier les méthodes de culture au champ.....	175
3. Étudier le rayonnement.....	175
4. Étudier l'impact de la phénologie de l'interaction blé/ <i>Fusarium</i>	176
La fusariose : un modèle d'étude de maladie multi-pathogène	178
1. Vers une meilleure compréhension des communautés de <i>Fusarium</i> impliquées dans la fusariose de l'épi.....	178
2. Les mycotoxines : profils complexes et profils cachés.....	178
3. Du champ au laboratoire : une appréhension nouvelle de l'appartenance des espèces de <i>Fusarium</i> à différentes niches écologiques.....	179
4. De l'analyse des comportements des espèces <i>in vitro</i> vers l'étude de l'interaction blé/ <i>Fusarium in planta</i>	180
5. La communauté synthétique : une nouvelle approche pour étudier les interactions complexes entre les espèces de <i>Fusarium</i>	181
6. La génomique : un outil pour la fine compréhension des interactions entre les espèces de <i>Fusarium</i>	181

CONCLUSION GÉNÉRALE.....184

Références bibliographiques.....	187
Annexes.....	203
Résumé	208
Abstract	209

Publications scientifiques

Article scientifique soumis en septembre 2024 à Applied and Environmental Microbiology (AEM), accepté avec révisions mineures en janvier 2025 :

Garcia M-A., Mahmoud R., Bancal M-O., Bancal P., Bernillon S., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F., Foulongne-Oriol M. Ecophysiological behaviour of major *Fusarium* species in response to combinations of temperature and water activity constraints.

Communications scientifiques

1. Communications orales

Marie-Anne Garcia, Angélique Gautier, Agathe Roucou, Romain Valade, Zoé Delporte, Erwan Guichoux, Laetitia Pinson-Gadais, Florence Richard-Forget, Marie Foulongne-Oriol. Evolution of the mycotoxins risk associated with *Fusarium* spp. in French wheat fields over 15 years. **European *Fusarium* Seminar, 12-15 Juin, 2023, Rome, Italie.**

Marie-Anne Garcia, Angélique Gautier, Agathe Roucou, Romain Valade, Zoé Delporte, Erwan Guichoux, Laetitia Pinson-Gadais, Florence Richard-Forget, Marie Foulongne-Oriol. *Fusarium* spp. occurrence in French wheat fields. **Fusatox, 19-20 Octobre, 2023, Bordeaux, France.**

2. Poster

M-A. Garcia, S. Bernillon, R. Mahmoud, J-A. Guerrero-Analco, J-L. Monribot-Villanueva, L. Pinson-Gadais, M. Moinard, M. Maurin, V. Atanasova, J-M. Savoie, F. Richard-Forget, M. Foulongne-Oriol. Effect of temperature variation on growth and exometabolome of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in *in vitro* co-cultures. **Journées Jean Chevaugéon, 15-19 Janvier, 2024, Aussois, France.**

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
(15 ou 3) ADON : (15 ou 3)-acétyldéoxynivalénol
ARNr : acide ribosomique
ASV : variant de la séquence d'amplicon / Amplicon Sequence Variants
Aw : activité de l'eau / water activity
BEA : beauvéricine
CO₂ : dioxyde de carbone
DAS : diacétoxyscirpénol
DON : Déoxynivalénol
ENN (A/A1, B/B1) : enniatine (A, A1, B ou B1)
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDM : *Fusarium* defined media
FHB : fusariose de l'épi de blé / Fusarium Head Blight
FX : fusarénone
Genotoul : plateforme de Génome et Transcriptome de Toulouse
GES : gaz à effet de serre
GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HCA : Hierarchical Cluster Analysis
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
ITS : Internal Transcribed Spacer
LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse
Mha : millions d'hectare
Mt : millions de tonne
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NGS : séquençage à haut débit / next-generation sequencing
NIV : nivalénol
ONU : Organisation des Nations Unies
OTU : unités taxonomiques opérationnelles / Operational Taxonomical Unit
PCR/ qPCR : réaction de polymérisation en chaine / quantitative
PGTB : Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux
QL : limite de quantification
ROS : espèces réactives de l'oxygène
TCTA : trichothécènes de type A
TCTB : trichothécènes de type B
ZEA : zéaralénone

Liste des Figures et Tableaux

Préambule et introduction générale

Figure 1 : Evolution passée et future de la population mondiale.

Figure 2 : Prédiction des effets de différents scénarios du changement climatique sur le rendement mondial de maïs (adaptée de Calvin et al., 2023).

Figure 3 : Production (en millions de tonnes) de céréales en France (adaptée de « *Des chiffres et des céréales - L'essentiel de la filière*, Intercéréales, 2023 »).

Figure 4 : Épillets de blés échaudés, symptôme reconnaissable de la FHB.

Figure 5 : Arbre phylogénétique des espèces du genre *Fusarium* (adaptée de Geiser et al., 2021).

Figure 6 : Schéma du triangle de pathogénicité de la FHB.

Figure 7 : Cycle de vie de *F. graminearum*, associé au développement de la fusariose des épis sur le blé (adapté de Trail, 2009).

Figure 8 : Principales mycotoxines produites par les principales espèces de *Fusarium*.

Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'organisation des travaux de thèse.

Tableau 1 : Mycotoxines majoritaires et réglementation européenne associée dans les produits céréaliers (adaptée de Alshannaq and Yu, 2017).

Tableau 2 : Réglementation européenne des mycotoxines fusariennes dans les produits céréaliers.

Tableau 3 : Récapitulatif des températures et activités de l'eau testées sur la production de mycotoxine des principales espèces de *Fusarium* associées à la FHB.

BOX1

Figure A : Illustration des gènes du cluster Tri.

Figure B : Voies de biosynthèse simplifiées des TCTB et des TCTA (adaptée de Alexander et al., 2009).

Figure C : Régulation de la biosynthèse du DON par les facteurs environnementaux chez *F. graminearum* (source interne à MycSA).

Chapitre 1

Figure 1 : Représentation schématique du déroulement de la méthode NGS de métagénomique ciblée (adaptée de <https://pgtb.fr/la-metagenomique-ciblee/>).

Figure 2 : Positionnement de deux couples d'amorces utilisés pour caractériser les communautés de *Fusarium* par méthode NGS.

Figure 3 : Nombre d'ASV identifiés dans les contrôles négatifs.

Figure 4 : Nombre d'ASV identifiés dans les contrôles inter-run de séquençage.

Figure 5 : Nombre d'ASV identifiés au sein des répliques.

Figure 6 : Abondance relative des principaux ASV identifiés dans les Mock.

Figure 7 : Nombre de séquences total assignées aux 35 ASV les plus abondants, assignés au rang de l'espèce de *Fusarium* dans les échantillons environnementaux.

Figure 8 : Matrice des corrélations entre les espèces fusariennes majoritaires identifiées dans les échantillons environnementaux.

Figure 9 : Fréquence de détection des mycotoxines dans les échantillons environnementaux.

Figure 10 : Matrice des corrélations entre les mycotoxines identifiées dans les échantillons environnementaux.

Figure 11 : Distribution des espèces fusariennes en fonction des mycotoxines.

Figure 12 : Abondance relative des 14 espèces fusariennes majoritaires dans les échantillons environnementaux sur les 15 dernières années.

Figure 13 : Concentration de DON + ADON dans les échantillons de blé tendre et de blé dur sur les 15 dernières années.

Figure 14 : Concentration d'enniatives dans les échantillons de blé tendre et de blé dur sur les 15 dernières années.

Figure 15 : Récapitulatif des températures sur les parcelles échantillonnées sur les 15 dernières années.

Figure 16 : Récapitulatif de la pluviométrie sur les parcelles échantillonnées sur les 15 dernières années.

Figure 17 : Matrice des corrélations entre certaines mycotoxines identifiées dans les échantillons environnementaux et les facteurs climatiques.

Tableau 1 : Liste des souches de *Fusarium* utilisées pour la composition des Mock.

Tableau 2 : Echantillons contrôles au sein des différents runs de séquençage.

Tableau 3 : Evolution du jeu de données au cours des étapes de filtration.

Tableau 4 : Récapitulatif des espèces fusariennes majoritaires identifiées dans les échantillons environnementaux.

Tableau 5 : Fréquence des espèces fusariennes majoritaires identifiées dans les échantillons de blé tendre et de blé dur sur les 15 dernières années.

Chapitre 2, Partie 1

Figure 1: Growth frequency (f_g) and growth parameters (τ , K , r and V_{max}) for the five *Fusarium* species, according to environmental variation.

Figure 2: Modelling growth probability with logistic regression for the five *Fusarium* species, according to environmental variation.

Figure 3: Response surface plots of growth parameters values for the five *Fusarium* species, according to combined abiotic conditions (a_w and Θ).

Figure 4: Variance partitioning of growth parameters (τ , K , r and V_{max}) according to species, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions.

Figure 5: Variance partitioning of growth parameters (τ , K , r and V_{max}) according to intraspecific and interspecific diversity.

Figure 6: Variance partitioning of growth parameters (τ , K , r and V_{max}) for the five *Fusarium* species, according to strain, environmental factors and their interactions.

Figure 7: Mycotoxin production by the five *Fusarium* species under environmental variation.

Figure 8: Probability of mycotoxin production for the five *Fusarium* species, according to environmental variation.

Figure 9: Principal component analysis of mycotoxin and growth parameters (τ , K , r and V_{max}) for the five *Fusarium* species.

Supplementary Figure 1: Spatial distribution of plate and medium absorbance at $\lambda = 630\text{nm}$.

Supplementary Figure 2 : Graphical significance of growth parameters (τ , K , r and V_{max}).

Supplementary Figure 3 : Details of mycotoxin produced by the five *Fusarium* species under environmental variation.

Supplementary Figure 4 : Frequency of mycotoxin production for the five *Fusarium* species depending on environmental variation.

Supplementary Figure 5 : Effects of environmental factors (a_w and Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$) on mycotoxin production for the five *Fusarium* species.

Supplementary Table 1. Strain metadata.

Supplementary Table 2. ANOVA results of interspecific diversity of the growth parameters (τ , K , r and V_{max}).

Supplementary Table 3. ANOVA results of the *F. avenaceum* growth parameters (τ , K , r and V_{max}).

Supplementary Table 4. ANOVA results of the *F. graminearum* growth parameters (τ , K , r and V_{max}).

Supplementary Table 5. ANOVA results of the *F. langsethiae* growth parameter (τ , K , r and V_{max}).

Supplementary Table 6. ANOVA results of the *F. poae* growth parameters (τ , K, r and Vmax).

Supplementary Table 7. ANOVA results of the *F. tricinctum* growth parameters (τ , K, r and Vmax).

Supplementary Table 8. Bayesian Information Criterion (BIC) of the different censored ANOVA models for mycotoxin production of the five *Fusarium* species.

Chapitre 2, Partie 2.1

Figure 1 : Quantités d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum* ou *F. poae*, sous différentes conditions environnementales.

Figure 2 : Production de mycotoxine dans les cocultures sous différentes conditions environnementales.

Figure 3 : Quantités de DON et ADON produites par les différentes souches de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum*, sous différentes conditions environnementales.

Figure 4 : Quantités d'ENN produites par *F. avenaceum* en coculture avec différentes souches de *F. graminearum*, sous différentes conditions environnementales.

Figure 5 : Quantités de DON et ADON produites par les différentes souches de *F. graminearum* en coculture avec *F. poae*, sous différentes conditions environnementales.

Figure 6 : Quantités de DAS produites par *F. poae* en coculture avec différentes souches de *F. graminearum*, sous différentes conditions environnementales.

Tableau 1 : Couples d'amorces utilisés pour la quantification d'ADN fongique par qPCR.

Chapitre 2, Partie 2.2

Figure 1 : Quantités d'ADN de *F. graminearum* et *F. poae* en coculture sous différentes conditions thermiques.

Figure 2 : Heatmap (distance euclidienne et algorithme de Ward) des différents signaux *m/z* identifiés dans les échantillons à 25 °C.

Figure 3 : Diagramme de Venn représentant le nombre exact de signaux *m/z* partagés entre les échantillons des monocultures (*F. graminearum* I156 et *F. poae* I72) et de la coculture (I156/I72) à 25 °C.

Figure 4 : Heatmap (distance euclidienne et algorithme de Ward) des différents signaux *m/z* identifiées dans les échantillons à 30 °C.

Figure 5 : Diagramme de Venn représentant le nombre exact de signaux *m/z* partagés entre les échantillons des monocultures (*F. graminearum* I156 et *F. poae* I72) et de la coculture (I156/I72) à 30 °C.

Figure 6 : Analyse en composantes principales des signaux m/z identifiés dans les échantillons des monocultures (*F. graminearum* I156 et *F. poae* I72) et de la coculture (I156/I72) à 25°C et à 30°C.

Tableau 1 : Récapitulatif des échantillons analysés à 25°C et 30°C.

Tableau 2 : Couples d'amorces et sondes Taqman utilisés pour la quantification d'ADN fongique par qPCR.

Discussion générale et perspectives

Figure 1 : Schéma récapitulatif des conclusions et leviers identifiés dans ces travaux de thèse dans le but de prédire et anticiper la FHB.

Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif du nombre d'échantillons environnementaux étudiés dans le cadre de l'étude de métagénomique ciblée.

Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN au Sarkosyl.

Annexe 3 : Etapes de filtration pour créer la base de données utilisée pour les analyses de métagénomique ciblée.

Annexe 4 : Nombre de séquences total identifié pour les ASV assignés au rang de l'espèce de *Fusarium* dans les Mock.

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN en plaque 96 puits, au CTAB.

Annexe 6 : Proportion d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum*, sous différentes conditions environnementales.

Annexe 7 : Proportion d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. poae*, sous différentes conditions environnementales.

Préambule : les enjeux liés à l'étude

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) précise qu'un « système alimentaire durable assure la sécurité alimentaire et la nutrition pour tous sans compromettre les bases économiques, sociales et environnementales nécessaires pour assurer la sécurité alimentaire et la nutrition des générations futures » (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022).

Notre étude s'inscrit dans une démarche visant à assurer la sécurité alimentaire tout en limitant l'impact des systèmes de production sur l'environnement. À long terme, l'objectif est de développer un système alimentaire mondial durable.

1. L'enjeu de la sécurité alimentaire

En l'espace de 74 ans, la population mondiale a triplé (entre 1950 et 2024, Figure 1) et les prévisions démographiques de l'Organisation des Nations Unies (ONU) indiquent un chiffre de 9.7 milliards de personnes dans le monde à l'horizon 2050 (Figure 1). Cette dynamique de croissance pose ainsi de réels défis pour la sécurité alimentaire et la viabilité de la planète. En effet, l'ONU et la FAO s'alarment sur la croissance démographique qui se concentre dans les pays les moins avancés (PMA) et où les cas de sous-nutrition et malnutrition sont les plus courants. En 2021, la FAO a estimé qu'entre 702 et 828 millions de personnes ont souffert de la faim (FAO et al., 2022), l'Asie et l'Afrique étant les continents les plus touchés. La réorientation des politiques agricoles est donc aujourd'hui un enjeu primordial pour apporter un soutien à l'agriculture en ciblant des aliments nutritifs recommandés pour une alimentation saine. La FAO a mis en place un système de classification des produits alimentaires en fonction de leur niveau de consommation par habitant dans chaque pays tout en tenant compte des recommandations pour le pays concerné (FAO et al., 2022). Les produits sont ensuite répartis dans 3 catégories en fonction du niveau moyen de consommation actuel comparé au niveau recommandé. Sont qualifiés de hautement prioritaires les aliments dont la consommation est inférieure à 80% du niveau recommandé. Ainsi, il ressort du classement que les fruits et légumes sont hautement prioritaires dans plus de 75 % des pays observés. Il en est de même pour les produits laitiers et les produits de la mer dans 65% des pays. Les céréales, telles que le riz, le maïs ou le blé sont principalement catégorisées comme des aliments moyennement

prioritaires dans 75 % des pays observés, ce qui signifie que leur consommation par habitant se situe entre 80 et 120 % du niveau recommandé.

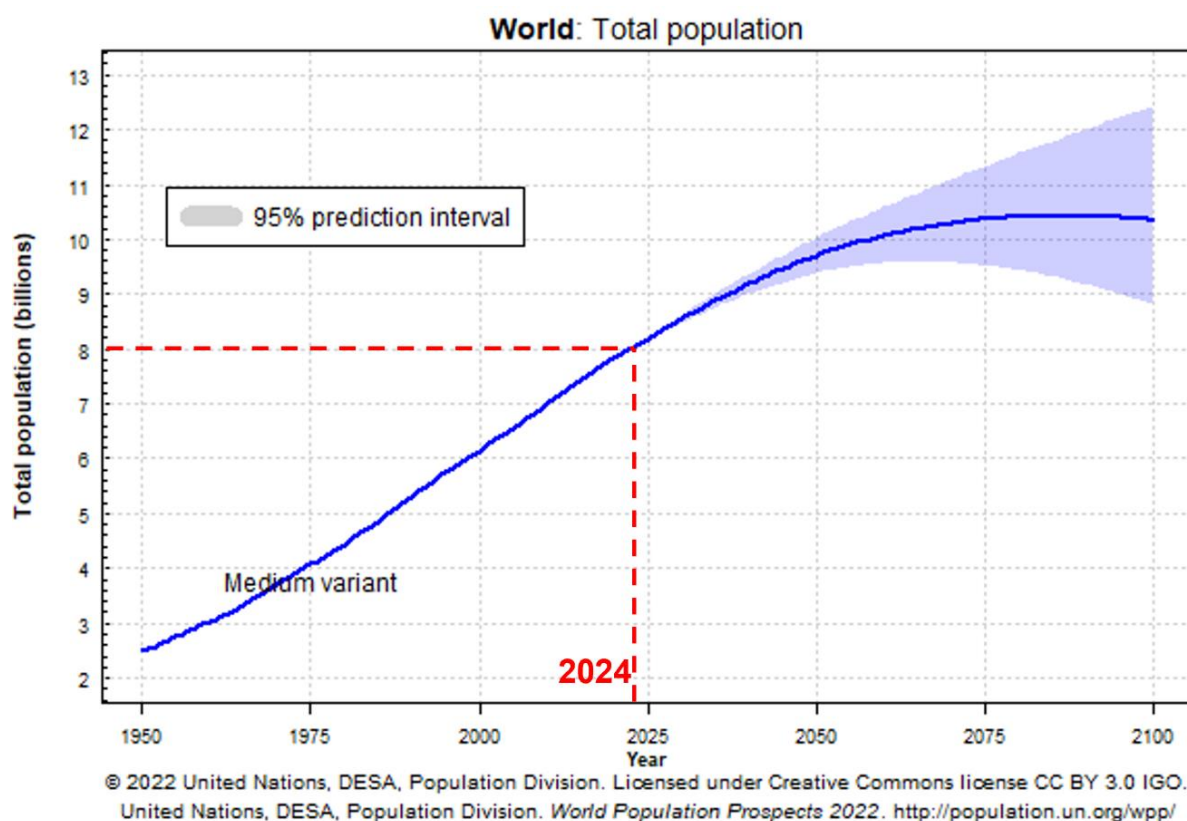


Figure 1 : Evolution passée et future de la population mondiale.

Dans ce contexte de croissance démographique, un objectif primordial est donc d'assurer la sécurité alimentaire dans le monde entier. Cependant, l'enjeu du changement climatique est également à prendre en compte car il est intimement lié à l'enjeu de sécurité alimentaire.

2. L'enjeu du changement climatique

Le système alimentaire mondial contribue fortement aux catastrophes naturelles induites par les changements climatiques. Cela implique la dégradation des sols et la perte de biodiversité. En parallèle, le changement climatique met en péril la sécurité alimentaire mondiale. C'est une problématique complexe et alarmante que la FAO classe aujourd'hui comme un défi planétaire majeur (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022).

En effet, dans le contexte actuel de croissance démographique, la nécessité de produire en plus grande quantité et plus vite entraîne des effets néfastes sur l'environnement. Il est indispensable de les limiter afin que les systèmes agroalimentaires mondiaux soient durables, sans contribuer significativement aux changements climatiques. Par exemple, l'émission de gaz à effet de serre (GES) est la principale cause du réchauffement climatique. Les systèmes alimentaires contribuent largement à leur émission (FAO et al., 2022). C'est ainsi que la FAO a mis en place une nouvelle stratégie d'adaptation au changement climatique, à l'horizon 2031. L'objectif est de développer des systèmes agroalimentaires résilients face au changement climatique et émettant peu de GES. Cependant, l'évolution vers un nouveau système agroalimentaire durable pose des problèmes économiques pour certains agriculteurs qui ne sont pas toujours en mesure de financer leur transition. La FAO recommande donc vivement un soutien économique des gouvernements pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022).

Le changement climatique a également un effet direct sur les productions agricoles. En effet, les émissions de GES, l'augmentation de la température atmosphérique, la montée du niveau des eaux, la sécheresse et autres événements climatiques extrêmes sont des facteurs environnementaux qui affectent directement la biodiversité, la santé humaine, mais également la production des cultures. Le dernier rapport du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) fait l'état des lieux des conséquences du changement climatique sur les systèmes naturels et humains, ainsi que des disparités qui devraient être observées à l'échelle régionale (Calvin et al., 2023). Le rapport s'intéresse notamment à la gravité des impacts du changement climatique futur sur la production alimentaire, et plus particulièrement sur la production mondiale de maïs (Figure 2). Trois scénarios d'impact du changement climatique sur le rendement du maïs ont été modélisés d'ici 2080-2099 par rapport à la période 1986-2005. Ces modèles prennent en considération trois niveaux d'augmentation de température (1.6-2.4, 3.3-4.8 et 3.9-6.0 °C) ainsi que les précipitations, le rayonnement solaire, l'humidité, le vent et la rétention d'eau par le CO₂ ont également été pris en compte pour l'élaboration du modèle de prédiction. La production de maïs serait donc fortement réduite par le changement climatique. Le GIEC précise que les risques climatiques et non climatiques, tels que la croissance

démographique ou les pandémies, vont de plus en plus interagir, ce qui engendrera des risques complexes, non prédictibles et difficilement gérables.

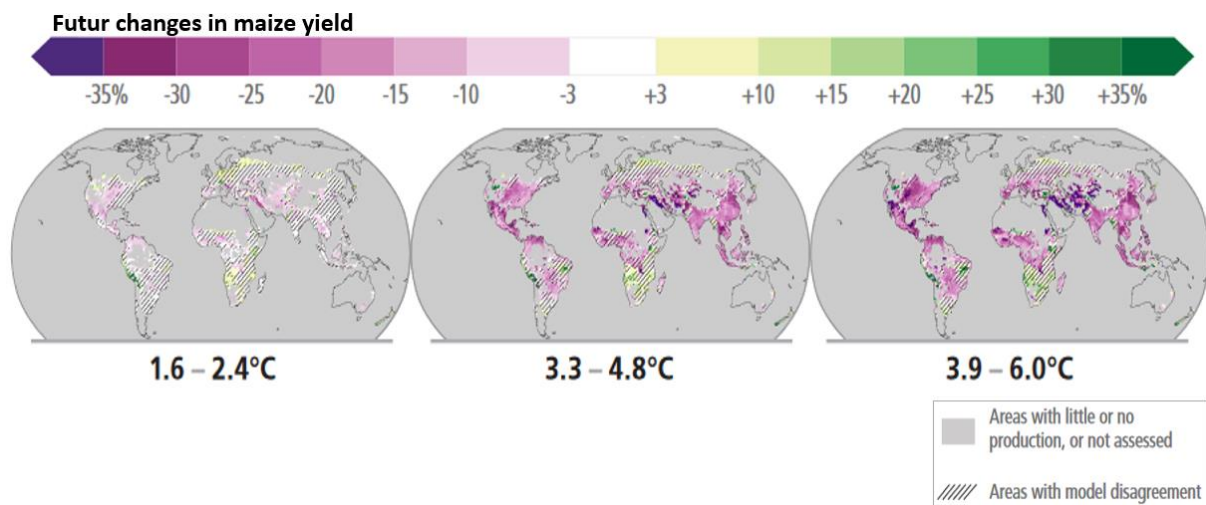


Figure 2 : Prédiction des effets de différents scénarios du changement climatique sur le rendement mondial de maïs (adaptée de Calvin et al., 2023). Plus les couleurs tendent vers le violet, plus le rendement du maïs est réduit. A l'inverse, plus les couleurs tendent vers le vert, moins le rendement est affecté.

Cependant, ce modèle présenté par le GIEC ne tient pas compte des ravageurs, des agents phytopathogènes, des maladies ou encore des évolutions agrotechnologiques. Tous ces paramètres sont à prendre en compte dans l'objectif d'anticiper les effets du changement climatique pour développer une agriculture durable.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La fusariose de l'épi de blé et ses agents pathogènes

1. L'importance des céréales dans le système alimentaire

Les céréales sont une ressource primaire dans l'alimentation humaine et animale. Plus de 730 millions d'hectares (Mha) de céréales ont été cultivées dans le monde en 2022-2023 pour une production totale de 2 766 millions de tonnes (Mt). Les principaux producteurs sont la Chine et les Etats-Unis avec 569 et 408 Mt de céréales produites en 2022-2023, suivis par l'Inde et l'Union Européenne avec respectivement 295 et 269 Mt (*Des chiffres et des céréales - L'essentiel de la filière - Edition 2023, 2023*).

En Europe, la France est le premier pays producteur de céréales avec 9 Mha cultivés pour une production de 60.5 Mt en 2022 (*Des chiffres et des céréales - L'essentiel de la filière - Edition 2023, 2023*). Plus de la moitié de la production française de céréales est consacrée au blé tendre (Figure 3) dont une majeure partie des grains sera ensuite exportée (49 % de la production en 2022). Le reste est essentiellement dédié à l'alimentation animale et humaine.

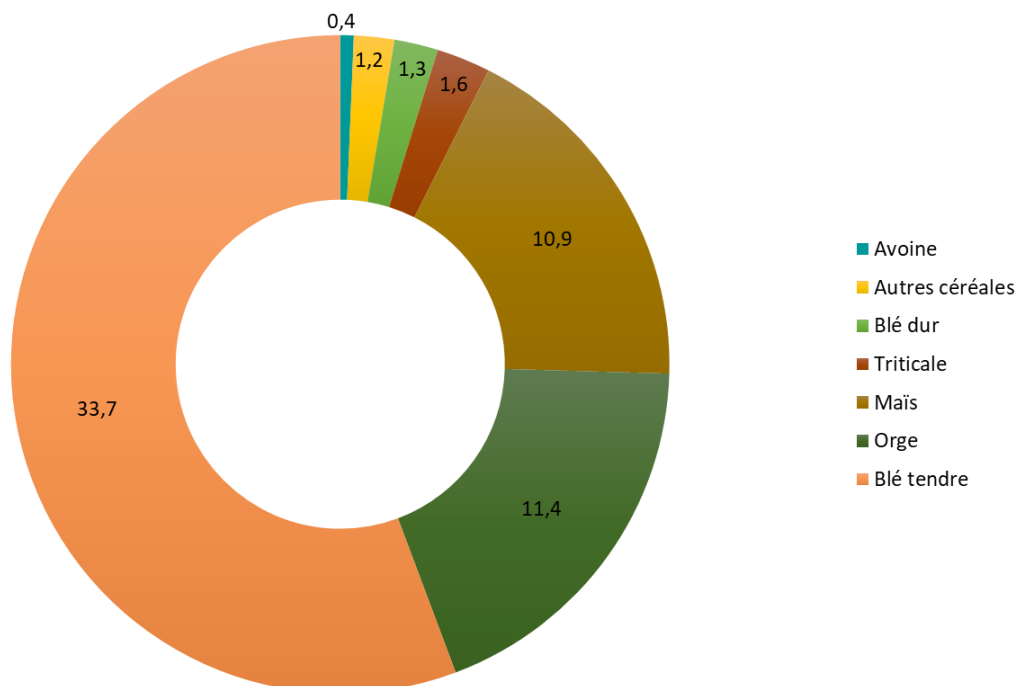


Figure 3 : Production (en millions de tonnes) de céréales en France (adaptée de « *Des chiffres et des céréales - L'essentiel de la filière*, Intercéréales, 2023 »)

Les céréales étant indispensables pour un régime alimentaire sain et équilibré, l'enjeu pour les agriculteurs, tout comme pour les consommateurs, est de protéger les

cultures afin de limiter les pertes de rendements et donc de production. En effet, les cultures sont soumises à des pressions abiotiques et/ou biotiques tout au long de leur cycle de culture (Chakraborty & Newton, 2011). On peut par exemple citer les attaques par des ravageurs tels que les oiseaux ou autres mammifères, les contaminations par des agents pathogènes (insectes, bactéries, champignons...) ou encore les variations environnementales dues au climat ou aux pratiques agricoles. Le type de culture, la variété utilisée, la localisation ou encore le stade phénologique sont des facteurs qui font varier la réponse des plantes aux différentes pressions (Chakraborty & Newton, 2011).

Les contaminations par les phytopathogènes fongiques ainsi que les variations climatiques et les pratiques agricoles sont les pressions biotiques et abiotiques qui nous intéressent particulièrement dans le cadre de cette thèse.

Ainsi, les agriculteurs peuvent être confrontés à des pertes de rendement directes, au champ, mais également indirectes, dues à une dégradation sanitaire des grains. En effet, des contaminations par des agents phytopathogènes sont à l'origine de maladies. Par exemple, on peut observer en France différentes maladies causées par des champignons phytopathogènes, telles que la septoriose, l'oïdium, les rouilles ou encore les fusarioses.

De plus, certains de ces phytopathogènes fongiques sont capables de produire des métabolites toxiques, aussi appelés mycotoxines, qui sont à l'origine de 5 à 10 % des pertes de récoltes annuelles mondiales (Focker et al., 2021). En Europe, les mycotoxines les plus préoccupantes pour la qualité sanitaire des grains sont produites par les champignons des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Alshannaq & Yu, 2017). Les mycotoxines produites par *Aspergillus* et *Penicillium* s'accumulent principalement lors du stockage des grains alors que celles produites par *Fusarium* contaminent les céréales avant la récolte (Charmet et al., 2017). La présence de certaines mycotoxines associées à la contamination par ces champignons est contrôlée et réglementée en Europe (Tableau 1).

Tableau 1 : Mycotoxines majoritaires et réglementation européenne associée dans les produits céréaliers (adaptée de Alshannaq and Yu, 2017).

Mycotoxine	Espèces fongiques	Produits céréaliers	Teneur maximale (µg/kg)*
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Mais, blé, riz	2 à 10
Ochratoxine A	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Blé, avoine, riz	0,5 à 5
Fusariotoxines	<i>Fusarium spp.</i>	Mais, blé, orge, avoine	50 à 4000**

* Teneur maximale dépend du produit céréalier concerné

** Teneur dépend de la mycotoxine concernée

Dans cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'étude de la fusariose de l'épi de blé, ou FHB pour « *Fusarium Head Blight* » en anglais. En effet, cette maladie, causée par les espèces fongiques du genre *Fusarium*, est particulièrement préoccupante, à la fois par les pertes de rendement directes générées au champ ; mais aussi indirectes dues aux contaminations en mycotoxines.

2. La fusariose de l'épi de blé : origine, symptômes et moyens de lutte

La FHB est une maladie causée par des agents phytopathogènes fongiques des genres *Fusarium* et *Microdochium* (Arseniuk et al., 1999). C'est une maladie préoccupante qui pose des problèmes sanitaires à cause de la contamination des grains par les mycotoxines et provoque de lourdes pertes économiques. Par exemple, entre 2007 et 2009, les pertes de rendement directes de la région Centre ont été estimées à 15 q/ha (Gourdain et al., 2016), ce qui porte fortement préjudice aux agriculteurs.



Figure 4 : Épillets de blés échaudés, symptôme reconnaissable de la FHB. © ARVALIS – Institut du végétal

La FHB est reconnaissable dès la formation des grains par l'échaudage des épillets, c'est-à-dire un flétrissement et un blanchiment des épis (Figure 4), ainsi que par l'atrophie des grains et leur couleur grise, brune ou rosée.

Certains facteurs agronomiques augmentent le risque de contamination et donc de développement de la FHB. Ainsi, des méthodes de lutte à l'échelle parcellaire ont été mises en place. D'une part, le choix des pratiques agricoles appliquées sur les parcelles est crucial dans la gestion de la maladie. Les rotations de cultures, alternant des plantes non sensibles avec des vecteurs de la maladie sont vivement recommandées pour limiter le risque d'infection par *Fusarium*. En effet le mycélium ou les spores sont capables d'être conservés dans les résidus de cultures d'une année à l'autre (Leslie et al., 2021). Il est également conseillé aux agriculteurs de pratiquer l'enfouissement et/ou le broyage des résidus. D'autre part, le choix variétal est un des leviers majeurs de la lutte contre la FHB. Il existe en effet des différences de sensibilité au sein des variétés de blé, malgré l'absence de résistance totale. Cependant, la sélection variétale est au cœur de nombreux sujets de recherches pour identifier des variétés de blés toujours moins sensibles (Leslie et al., 2021). Il est également conseillé aux agriculteurs de contrôler les dates de semis. En effet, le blé est particulièrement vulnérable au stade phénologique de la floraison, favorisée par des conditions climatiques chaudes et humides, également optimales pour la croissance fongique (Walter et al., 2010; Lenc, 2015). Les conditions climatiques sont donc également déterminantes dans le développement de la FHB.

A ce jour, la lutte phytosanitaire est très compliquée à mettre en place. En effet, les fongicides ont une efficacité préventive et incomplète car ils sont souvent spécifiques à une espèce de champignon en particulier. De plus, ces méthodes de lutte ne sont pas compatibles avec les enjeux actuels, portés par le plan Ecophyto II, visant à réduire l'utilisation de produits phytosanitaires en France. Cependant, la FHB est causée par une contamination par un mélange complexe d'espèces fongiques (Arseniuk et al., 1999), ce qui limite l'efficacité des fongicides actuels. Ainsi, il devient indispensable de développer des solutions alternatives aux fongicides pour lutter contre *Fusarium*. L'utilisation de solutions de biocontrôle est ainsi au cœur de nombreux sujets d'études (Leannec-Rialland et al., 2021; Tardif et al., 2024).

Le risque de contamination et de développement de la FHB dépend donc de nombreux facteurs, dont la composition de l'inoculum. On comprend ainsi la difficulté d'étudier, de comprendre et de maîtriser cette maladie.

3. Les espèces fongiques responsables de la FHB

La FHB est causée par la contamination de l'épi de blé par des espèces fongiques des genres *Fusarium* et *Microdochium*. On peut parler du pathobiome d'infection de la FHB, c'est-à-dire de la communauté de microorganismes infectant la plante et causant ainsi la maladie. Dans notre cas d'étude, nous nous intéresserons à la composition du pathobiome en espèces fusariennes uniquement. En effet, la FHB est le résultat d'une contamination par un mélange d'espèces fongiques, présentes en proportions aléatoires sur les grains. Jusqu'à 20 espèces différentes de *Fusarium* sont capables d'infecter le même épi de blé (Arseniuk et al., 1999).

Les champignons filamenteux du genre *Fusarium* sont des Ascomycètes qui appartiennent à la famille des Nectriacées. La proximité génétique de ces espèces rend leur distinction morphologique compliquée, ce qui a toujours donné lieu à des confusions et des débats. Ainsi, de nombreuses études ont été menées pour déterminer la phylogénie des espèces fusariennes. Le genre *Fusarium* a été divisé en 23 complexes d'espèce (Figure 5), comportant plus de 300 espèces phylogénétiquement distinctes (Arseniuk et al., 1999; O'Donnell et al., 2015 ; Geiser et al., 2021).

Fusarium graminearum est l'espèce historiquement associée à la FHB. Aujourd'hui, c'est toujours l'espèce prédominante mais elle est accompagnée d'autres espèces lors de l'infection. Par exemple, en Europe, *F. avenaceum* et *F. tricinctum* sont très souvent présents au champ et associés à la FHB (Xu et al., 2005; Vogelgsang et al., 2008; Beccari et al., 2018; Valverde-Bogantes et al., 2020). De récentes études ont également mis en évidence l'occurrence accrue d'autres espèces comme *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* ou encore *F. culmorum* (Valverde-Bogantes et al., 2020; Dubois & Roucou, 2023; Infantino et al., 2023).

La présence de ces espèces dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. En effet, depuis plusieurs années, les études aux champs mettent en évidence le lien entre la dynamique du changement des populations et les facteurs environnementaux

dont ceux liés au changement climatique (Osborne & Stein, 2007; Valverde-Bogantes et al., 2020).

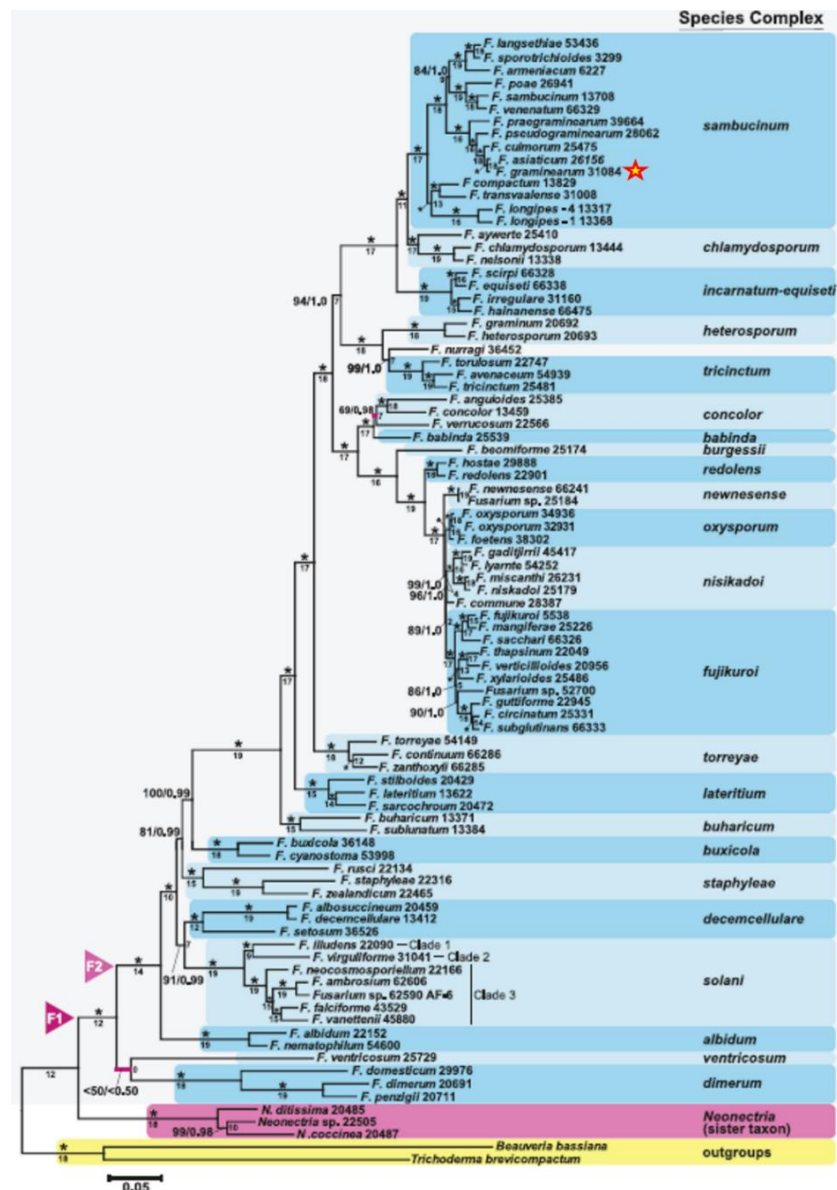


Figure 5 : Arbre phylogénétique des espèces du genre *Fusarium* (adaptée de Geiser et al., 2021). L'arbre est basé sur les séquences nucléotidiques de 19 gènes codants pour des protéines. Les nuances de bleu mettent en évidence les 23 complexes d'espèces du genre *Fusarium*. *Fusarium graminearum* est indiqué avec l'étoile.

Dans cette première partie, nous avons illustré l'existence de trois acteurs principaux, en constante interaction, aboutissant au développement de la FHB. Ceci fait référence à une notion d'épidémiologie végétale : le triangle de pathogénicité, regroupant les trois conditions nécessaires au développement d'une phytopathologie. Le triangle de pathogénicité de la FHB schématise ainsi les acteurs indispensables à son développement : les agents pathogènes sur le blé, l'environnement et le système de culture (Figure 6). De nombreux facteurs sont en constante interaction avec ces trois

acteurs principaux, leur relation étant constamment susceptible d'évoluer. En effet, le stade phénologique de la plante, le moment de la contamination, la composition du pathobiome d'infection, les pratiques agricoles appliquées à la parcelle ou encore le climat ; sont des facteurs en constante évolution, ce qui rend l'étude de ce triangle de pathogénicité très complexe. Ainsi, les connaissances précises sur les espèces fusariennes sont indispensables pour comprendre la FHB et pouvoir développer des outils de maîtrise.

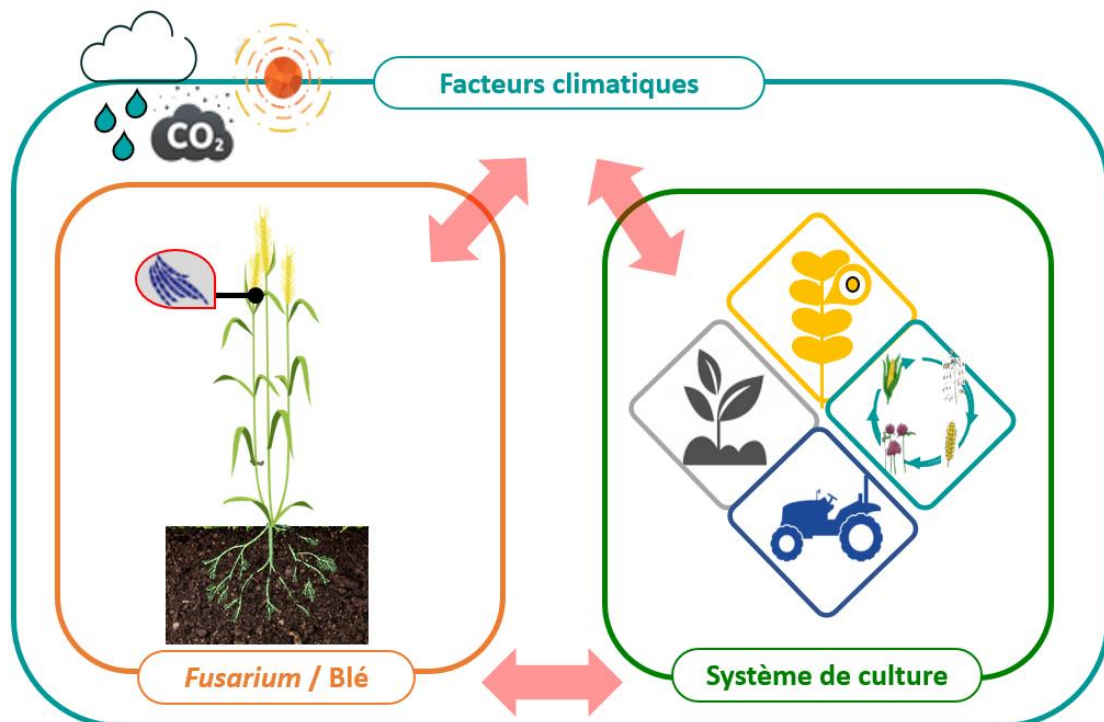


Figure 6 : Schéma du triangle de pathogénicité de la FHB.

Les espèces toxigènes du genre *Fusarium spp.*

1. Le cycle de vie et de reproduction de *F. graminearum*

La croissance végétative des espèces fusariennes se réalise sous la forme de filaments haploïdes, les hyphes. Tout au long de son cycle de vie, *Fusarium* alterne entre les modes trophiques et des phases de reproduction asexuée et sexuée (Trail, 2009). Cependant, seulement 20 % des espèces du genre *Fusarium* ont un cycle sexué connu (Ma et al., 2013). Ainsi, nous présenterons dans cette introduction le cycle de vie de *F. graminearum* sur le blé, qui est le plus documenté.

La phase de reproduction asexuée est assurée par des spores appelées conidies, qui représentent une source importante d'inoculum (Figure 7). Durant l'hiver, les conidies sont conservées dans le sol et les résidus de cultures, leur dispersion étant à courte distance (Figure 7). Trois types de spores asexuées ont été identifiées en fonction de l'espèce fusarienne contaminante (Ma et al., 2013) : les microconidies (produites par *F. oxysporum*, *F. solani* ou *F. verticillioïdes*), les macroconidies (*F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani* ou *F. verticillioïdes*) et les chlamydospores (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. pseudograminearum* ou *F. solani*). Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables (chaleur et humidité), les conidies germent et engendrent, par mitoses successives, la formation de mycélium haploïde (Figure 7.A). Cependant, la production et la germination des conidies sont mineures sur l'incidence de la FHB, en comparaison avec les spores produites lors de la phase sexuée (Wegulo et al., 2015).

La phase de reproduction sexuée peut-être hétérothallique (fécondation entre deux souches de types sexués opposés) ou homothallique (autofécondation). Chez *F. graminearum*, deux allèles de types sexuels opposés sont présents sur le gène du « mating-type » (MAT), ce qui lui confère sa capacité d'autofécondation (Yun et al., 2000). La reproduction hétérothallique nécessite une fécondation entre deux souches de types sexuels opposés. Dans ce cas, la rencontre et la fusion de deux mycelia sont suivies par un stade dicaryotique puis diploïde pour former les périthèces (Figure 6.B ; Trail and Common, 2000). A la fin de l'été, ces organes de fructification se retrouvent dans les résidus de culture (Trail, 2009). A ce stade, le mode de vie de *F. graminearum* est saprophyte car il se nourrit de matière morte (Goswami & Kistler, 2004). Les périthèces sont des structures très importantes dans le cycle de *F. graminearum*. En

effet, ils permettent la conservation du champignon dans le sol et sont également le lieu de production de spores sexuées. Les ascospores sont ainsi formées après méiose des cellules diploïdes contenues dans les périthèces (Figure 7.C ; Trail and Common, 2000).

Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, c'est-à-dire chaleur et humidité, la maturation des périthèces engendre la libération des ascospores qui représentent l'inoculum primaire des épidémies de FHB (Figure 7.C ; Goswami and Kistler, 2004). Elles sont disséminées à plus ou moins longue distance par le vent, les insectes ou encore les phénomènes de « splashing » par projections de gouttelettes de pluie (Maldonado-Ramirez et al., 2005; Schmale lii et al., 2006; Osborne & Stein, 2007; Prussin et al., 2014). Après germination des ascospores sur les épis de blé, le pathogène se développe d'abord de façon asymptomatique, et donc biotrophe, dans l'espace extracellulaire des tissus végétaux (Figure 7.D ; Brown et al., 2010). Le champignon pénètre ensuite dans le blé sous forme d'hyphes haploïdes par des ouvertures naturelles (Figure 7.D). La production d'enzymes impliquées dans la dégradation des parois ainsi que de protéases favorise la pénétration du champignon et la colonisation des tissus (Walter et al., 2010). Par la suite, la progression intracellulaire est assurée par une structure formée d'hyphes irréguliers, comparables aux appressoria, aussi appelée « coussins d'infections » chez *F. graminearum* (Boenisch & Schäfer, 2011). L'apparition de nécroses sur les épis traduit le passage du pathogène au stade nécrotrophe (Figure 7.A ; Brown et al., 2010; Kazan et al., 2012).

La contamination par les espèces fusariennes peut également s'accompagner d'une production de mycotoxines et donc d'une dégradation de la qualité sanitaire des grains de blé (Figure 7.E).

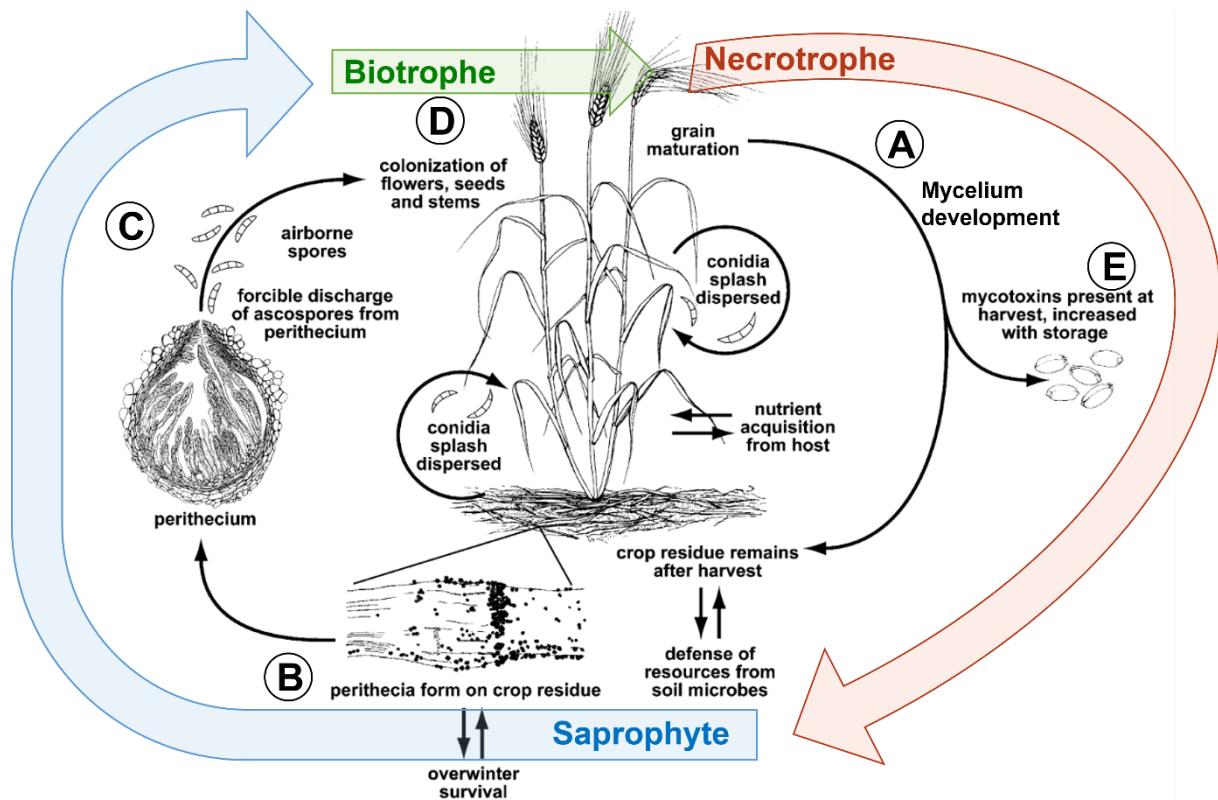


Figure 7 : Cycle de vie de *F. graminearum*, associé au développement de la fusariose des épis sur le blé (adapté de Trail, 2009).

2. Les mycotoxines produites par *Fusarium* spp.

Les espèces fusariennes sont connues pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques appelés mycotoxines. Ces molécules s'accumulent majoritairement pendant la croissance du grain. La toxicité de ces molécules représente un réel danger pour les consommateurs, humains et animaux. Ainsi, en Europe, certaines de ces mycotoxines font l'objet d'une réglementation stricte qui vise à limiter la commercialisation des lots de grains contaminés. Ceux-ci sont alors redirigés vers d'autres débouchés de la transformation alimentaire.

Les mycotoxines produites par les champignons du genre *Fusarium* appartiennent à différentes familles : les trichothécènes (TCT), les enniatines (ENN), la beauvéricine (BEA) et les fumonisines (FUM ; Figure 8). Ces familles de mycotoxines sont issues de différentes voies de biosynthèse (Voir Box 1 pour l'exemple de la voie de biosynthèse des TCTs / pour les ENN : Glinski et al., 2002; Hornbogen et al., 2002; Jestoi, 2008; Gautier et al., 2020a / pour la ZEA : Nahle et al., 2021). Chaque espèce

de *Fusarium* présente son propre spectre de production de mycotoxines (Figure 8) et appartient ainsi à un chémotype spécifique.

Parmi les TCT, quatre grandes classes de mycotoxines sont identifiées dont deux sont plus particulièrement associées à des espèces fusariennes: les TCT de types B (TCTB) et les TCT de type A (TCTA ; Figure 8).

Les TCTB regroupent plusieurs mycotoxines : le deoxynivaléol (DON) et ses formes acétylées, le 3-acétyldeoxynivaléol (3-ADON) et le 15-ADON ; le nivaléol (NIV) et sa forme acétylée la fusarenone-X (FX ; Figure 8). Les espèces productrices de TCTB peuvent présenter le chémotype NIV en produisant NIV et/ou FX ; ou bien le chémotype DON en produisant DON/3-ADON ou DON/15-ADON.

Les TCTA regroupent majoritairement les mycotoxines monoacétoxyscirpenol (MAS), diacétoxyscirpénol (DAS), T-2 et HT-2 (Figure 8), la DAS étant un précurseur de T-2 et HT-2.

Enfin, la famille des ENN comporte quatre mycotoxines majeures : l'enniatine A (ENNA), l'enniatine A1, B et B1 (Figure 8).

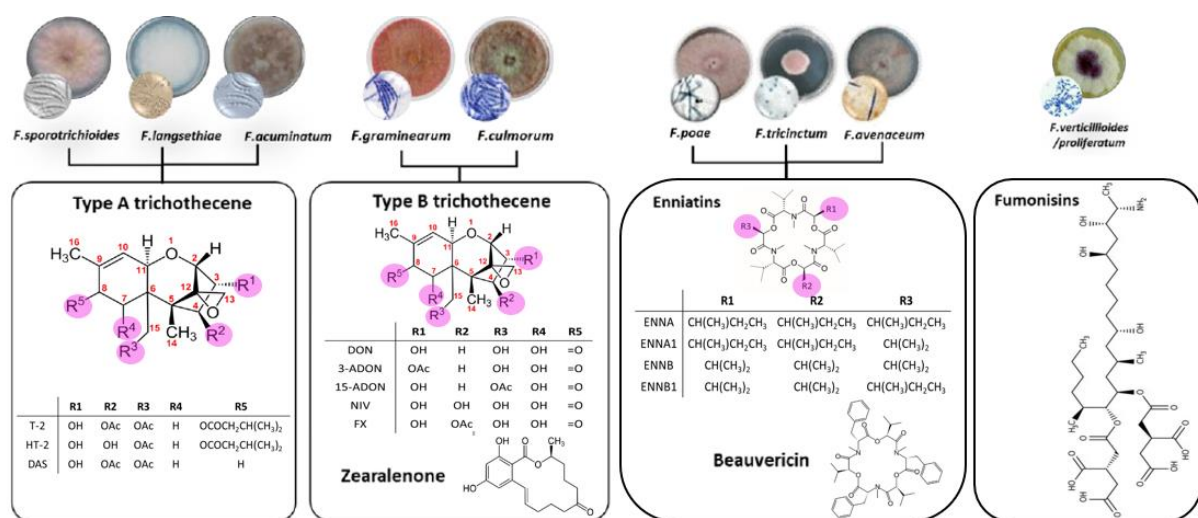


Figure 8 : Principales mycotoxines produites par les principales espèces de *Fusarium*.

De façon générale, les mycotoxines produites par les *Fusarium* sont connues pour leur effet cytotoxique (Langseth et al., 1999), bien qu'elles aient différentes répercussions sur la santé.

Plus précisément, les TCT sont des mycotoxines immunosuppressives qui inhibent la synthèse des protéines chez les organismes eucaryotes (Cundliffe et al., 1974; Ueno

and Matsumoto, 1975; Cundliffe and Davies, 1977). Les TCTB sont spécialement décrits comme des mycotoxines phytotoxiques et également les plus fréquemment associées à la FHB, tout particulièrement pour le DON (Knutsen et al., 2017). Les TCTA sont plus toxiques que les TCTB mais sont moins fréquentes et produites en plus faible quantité (Eudes et al., 2000; Steinmetz et al., 2009). La ZEA est oestrogénique, c'est-à-dire qu'elle est toxique pour le système de reproduction, pouvant entraîner l'infertilité (Fink-Gremmels & Malekinejad, 2007).

Les ENN et la BEA présentent des propriétés ionophoriques, leur permettant d'agir sur l'intégrité des membranes biologiques (Mallebrera et al., 2018). Cependant, à ce jour, même s'il est fortement suspecté que l'exposition chronique aux ENN et à la BEA pourrait être préoccupante, aucune conclusion ferme n'étaye cette hypothèse.

Depuis 2006, une réglementation européenne s'applique sur certaines mycotoxines produites par les *Fusarium* (Tableau 2). Récemment, en avril 2024, le règlement européen a été révisé. D'une part, le seuil de tolérance en DON dans certains produits céréaliers a été abaissé (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2024). D'autre part, la teneur en T-2 et HT-2 est maintenant réglementée (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2024).

Tableau 2 : Réglementation européenne des mycotoxines fusariennes dans les produits céréaliers. Règlements (UE) 2024/1022 et 2024/1038 du 8 et 9 avril 2024 relatifs aux contaminants dans les denrées pour l'alimentation humaine. Les mycotoxines telles que DAS, ENN ou BEA n'apparaissent pas dans ce Tableau car elles ne sont concernées par aucune réglementation à ce jour. La mise à jour 2024 de la réglementation européenne est mise en évidence en caractères gras et rouge.

Mycotoxine	Espèces fongiques	Produits céréaliers	Teneur maximale (µg/kg)*
Fumonisine	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Maïs	4000
Déoxynivalénol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Maïs, blé, orge	1500 (blé dur et maïs) 1000 (autres céréales brutes)
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Maïs, blé, orge	350 (maïs) 100 (autres céréales brutes)
T-2 / HT-2	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i>	Avoine, maïs, blé, orge	100 (blé dur et maïs) 50 (autres céréales brutes)

* Teneur maximale dépend du produit céréalier concerné

Les mycotoxines produites par les champignons du genre *Fusarium* sont donc détectées sur divers produits céréaliers. Leur voie de biosynthèse, et donc leur production, peut directement être impactée par les conditions environnementales et principalement météorologiques. Ainsi, l'occurrence des mycotoxines est variable en fonction des espèces fusariennes prédominantes au champ, du climat et des années.

Tout au long de cette deuxième partie d'introduction, nous avons mis en évidence les généralités connues sur les espèces fusariennes responsables de la FHB, concernant leur cycle de développement et les mycotoxines qu'elles produisent.

Cependant, nous avons également mis en évidence un certain nombre de points qui ne sont pas encore éclaircis par la littérature. En effet, le cycle de vie de *F. graminearum* est très bien documenté mais ce n'est pas le cas pour les autres espèces. Il en est de même pour les voies de biosynthèse des différentes classes de mycotoxines et des différents facteurs impliqués dans la régulation de ces voies.

Enfin, le climat est clairement reconnu comme un acteur principal au sein du triangle de pathogénicité. En effet, il est capable d'agir à tous les niveaux : sur la plante, comme sur le pathogène. **Ainsi, nous nous intéresserons, dans la prochaine partie, à l'effet de l'environnement sur les espèces fusariennes.**

BOX1 : VOIES DE BIOSYNTHESE DES TRICOTHÉCÈNES.

Un cluster de gènes de biosynthèse regroupe toutes les enzymes, transporteurs et facteurs de régulation impliqués dans la biosynthèse du métabolite final. La production de trichothécènes (TCTs) par *Fusarium* est codée par l'expression de 12 gènes regroupés au sein du cluster Tri5, associés à deux gènes du cluster « Two genes » et le gène unique Tri101 (Figure A ; Alexander et al., 2009). Chaque gène du cluster Tri joue un rôle dans la voie de biosynthèse des TCTB et des TCTA.



Figure A : Illustration des gènes du cluster Tri.

Les voies de biosynthèse des TCTB et des TCTA sont initialement communes puis se distinguent lors de l'activation du gène Tri1 ou Tri13 respectivement, après la synthèse de calonectrine (Figure B). Il en est de même pour la synthèse du NIV ou du DON et de ses formes acétylées. En effet, si les gènes Tri13 ou Tri7 ne sont pas fonctionnels, alors le gène Tri8 sera exprimé et permettra ainsi la biosynthèse de 15-ADON, 3-ADON puis DON (Alexander et al., 2009).

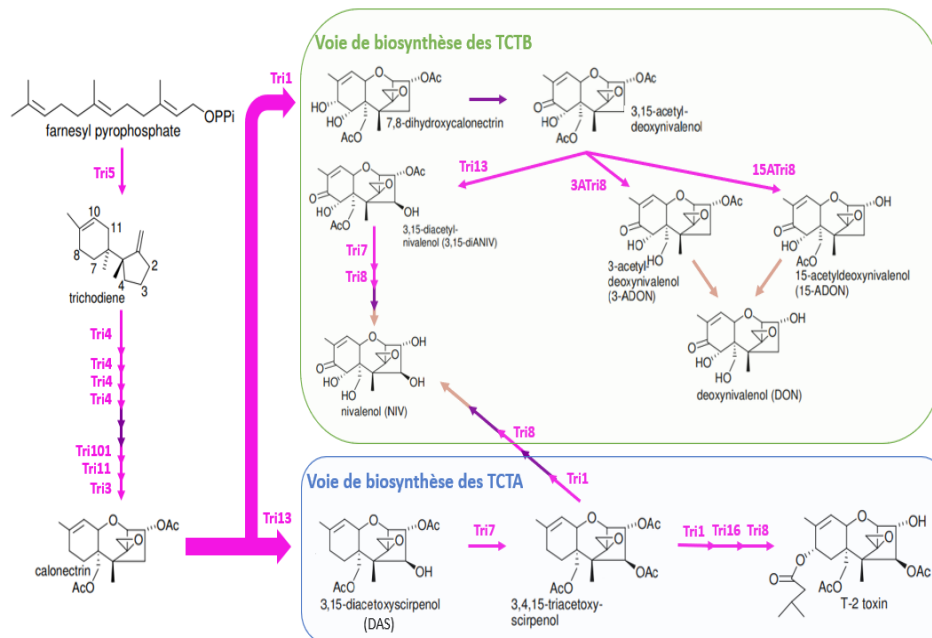


Figure B : Voies de biosynthèse simplifiées des TCTB et des TCTA (adaptée de Alexander et al., 2009). Les flèches violettes indiquent l'activation de gènes inconnus pour produire la molécule suivante et les flèches beiges indiquent l'activation de gènes inconnus, sans savoir si des molécules intermédiaires sont également synthétisées.

L'expression des gènes du cluster Tri est régulée par l'action de stimuli environnementaux. Par exemple, la production de TCTB est liée à des régulateurs transcriptionnels, dont ceux impliqués dans la réponse à la température, au pH ou à la lumière (Figure C ; (Merhej et al., 2011; Audenaert et al., 2013; Kim et al., 2013; Ramirez Albuquerque et al., 2021).

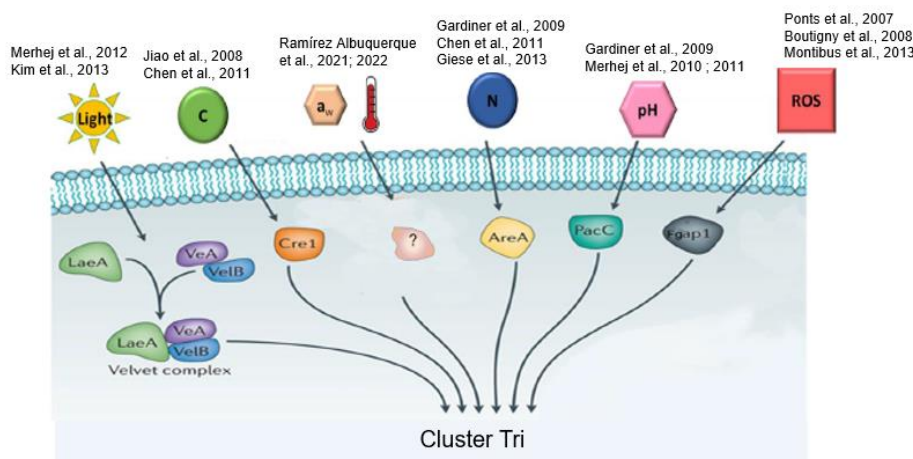


Figure C : Régulation de la biosynthèse du DON par les facteurs environnementaux chez *F. graminearum* (source interne à MycSA)

Distribution des espèces fusariennes et les changements environnementaux

1. Occurrence des espèces de *Fusarium* au champ

Le changement climatique est aujourd'hui au cœur de nombreux sujets de la littérature. Le sixième rapport du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) synthétise les différents risques liés au changement climatique et les conclusions sont alarmantes (Calvin et al., 2023). Dans ce contexte, les écosystèmes vont être amenés à faire face à des pressions environnementales changeantes, modifiant les relations et les interactions des phytopathogènes (Garcia-Cela et al., 2018). C'est ainsi que la composition du pathobiome d'infection de la FHB et le risque mycotoxine associé vont être amenés à évoluer, sous l'effet de pressions environnementales, favorisant, ou non, la présence de certaines espèces fusariennes au champ.

De nombreuses études ont mis en évidence la prédominance de certaines espèces, et des mycotoxines associées, en fonction des conditions environnementales. En ce qui concerne les *Fusarium* producteurs de TCTB, les études de Pasquali et al. (2016) et de Del Ponte et al. (2022) décrivent la répartition des chémotypes au niveau européen et mondial. En Europe, *F. culmorum*, producteur de DON/3-ADON est majoritaire dans les pays scandinaves alors que *F. graminearum*, producteur de DON/15-ADON est le principal chémotype rencontré dans les zones plus tempérées. Les souches de chémotype NIV sont aussi plus fréquemment rencontrées dans les pays du Nord et de l'Est de l'Europe. Dans la revue de Van Der Lee et al. (2015), il est suggéré qu'il n'existe pas de communauté fusariennes globale mais plusieurs populations avec des préférences géographiques, d'hôte, de climat ou de pratiques culturales à l'échelle interspécifique.

De récents rapports sur les modifications dans les populations fusariennes associées à la FHB ont montré que ces populations sont dynamiques et changent constamment dans le temps, le remplacement d'une espèce de *Fusarium* par une autre étant fréquemment observé au champ (Valverde-Bogantes et al., 2020). Par exemple, en Italie, *F. graminearum* était l'espèce prédominante sur blé en 1995. Cependant, sa distribution a diminué au fil des années, tandis que celles de *F. poae* et *F. culmorum* ont augmenté, jusqu'à ce que son remplacement soit observé en 2007 (Pancaldi et al.,

2010). Le même remplacement d'espèce a été identifié sur les blés en République Tchèque, avec une prédominance de *F. poae* en 2012 (Chrprová et al., 2016). Ce remplacement d'espèce peut en partie être expliqué par la préférence des climats très chauds et secs pour *F. poae* tandis que la présence de *F. graminearum* est favorisée par des étés moyennement chauds (Banik et al., 2018; Nogueira et al., 2018; Valverde-Bogantes et al., 2020; Van Der Lee et al., 2015).

Des changements dans les profils de production de mycotoxines peuvent également avoir lieu. Cela a été le cas sur différentes céréales en Amérique du Nord avec une diminution progressive, au cours des années et du nord vers le sud, du profil 3-ADON pour le profil 15-ADON chez *F. graminearum* (Liang et al., 2014; J. Liang et al., 2015; Burlakoti et al., 2017).

Enfin, l'introduction de nouvelles espèces ou de nouveaux isolats, plus ou moins agressifs ou compétiteurs, peut être observée dans certaines régions, entraînant des changements radicaux dans la composition des populations (Valverde-Bogantes et al., 2020). Par exemple, Boutigny et al. (2019) ont identifié, pour la première fois en France, une contamination par *F. proliferatum* des échantillons de blé récoltés au champ entre 2014 et 2015.

Le changement climatique est documenté comme un acteur majeur dans l'évolution du risque de contamination par les mycotoxines. La récente revue de Casu et al. (2024) fait un état des lieux des recherches scientifiques menées à ce sujet sur les 24 dernières années. Globalement, l'augmentation de la température favorise la dynamique des populations par l'introduction ou la migration d'espèces, les espèces fongiques thermotolérantes et productrices de mycotoxines étant ainsi prédominantes. La plupart des études se sont intéressées à la production de DON par *F. graminearum* et ont mis en évidence qu'une augmentation du niveau de contamination par cette mycotoxine est à prévoir dans les régions du Nord de l'Europe, où le climat se réchauffe (Gagiu, 2018).

Toutes les études précédemment citées concluent sur un point commun : la dynamique des populations fusariennes au champ dépend de nombreux facteurs environnementaux comme le climat, les pratiques agricoles, la plante hôte ou encore son stade phénologique. **Cependant, il s'avère compliqué de déterminer si la dynamique des populations au champ s'explique par un effet direct des facteurs environnementaux sur les espèces ou sur la production de mycotoxines, ou bien**

si ce sont des évènements en cascade. La façon dont ces facteurs agissent sur les agents phytopathogènes de la FHB reste donc un sujet vaste à explorer, que nous aborderons dans la partie suivante.

2. Écophysiologie des espèces de *Fusarium*

Pour comprendre comment les espèces de *Fusarium* sont impactées par leur environnement, et plus particulièrement par le changement climatique, il est important d'étudier comment elles se comportent face à des pressions abiotiques. L'écophysiologie vise précisément à étudier les réponses comportementales et physiologiques des êtres vivants dans leur environnement. Dans le cas des phytopathogènes associés à la FHB, l'étude de leurs caractéristiques écophysiologiques s'avère être un point clef dans la compréhension de leur capacité à contaminer les champs. En effet, lors de l'infection, les différentes espèces fusariennes partagent la même niche écologique, c'est-à-dire le même environnement avec les mêmes pressions biotiques et abiotiques. Cependant, comme introduit dans le paragraphe précédent, certaines espèces prédominent lors de l'infection, suggérant des réponses différentes aux conditions environnementales au sein de la niche écologique.

Dans ce cadre, de nombreuses études *in vitro* se sont intéressées à l'écophysiologie des espèces fusariennes (Ryu and Bullerman, 1999; Hope et al., 2005; Kokkonen et al., 2010, 2012; Mylona et al., 2012; Nazari et al., 2018; Gautier et al., 2020b ; Verheecke-Vaessen et al., 2021, 2022). De nombreux facteurs abiotiques ont été étudiés et ont notamment été démontrés comme étant potentiellement impliqués dans la régulation des voies de biosynthèse des mycotoxines (Box1, Figure C). Dans cette introduction, nous nous intéresserons particulièrement à la température et à l'activité de l'eau (a_w) qui seront les deux facteurs majeurs traités dans ce manuscrit.

Des optimums de croissance et de production de mycotoxines ont été mis en évidence à l'échelle interspécifique (Tableau 3). Les conclusions principales sont que les espèces de *Fusarium* présentent différents optimums de croissance et de production de mycotoxine en cultures *in vitro*. Par exemple, la croissance de *F. graminearum* est optimale entre 25 et 30 °C alors que sa production de DON l'est spécifiquement à 25 °C (Tableau 3). De même, *F. langsethiae* produit de façon optimale du DAS à 15 °C contre 20 °C pour T-2 et HT-2, alors que sa croissance est optimale à des

températures plus chaudes, entre 20 et 25 °C (Tableau 3). De plus, des différences sont également observées entre espèces, *F. graminearum* étant l'espèce la plus propice à la croissance et à la production de mycotoxines à des températures allant de 25 à 30 °C alors que *F. langsethiae* ou *F. avenaceum* sont favorisés par des températures plus fraîches (Tableau 3). Cependant il s'avère délicat de comparer les différentes études entre elles, chacune utilisant ses propres souches, des milieux de culture différents (milieux synthétiques solides ou liquides, ou directement sur grain) et des plages de température et d' a_w différents (Tableau 3). L'échelle intraspécifique n'a que très rarement été étudiée dans la littérature, les études concernées ne s'intéressant souvent qu'à deux souches provenant de la même zone géographique (Hope et al., 2005; Medina & Magan, 2011; Nazari et al., 2014; Peter Mshelia et al., 2020; Verheecke-Vaessen et al., 2022). Pourtant, une variabilité dans la réponse des différentes souches d'une même espèce aux changements environnementaux a été mise en évidence à plusieurs reprises dans ces mêmes études, confirmant l'existence d'une diversité intraspécifique dans les réponses aux changements environnementaux des espèces fusariennes.

Il a ainsi largement été démontré que les espèces fusariennes sont en constante interaction avec leur environnement, chacune présentant ses propres caractéristiques écophysiologiques, mais qu'en est-il des interactions entre différentes espèces de *Fusarium* ?

Tableau 3 : Récapitulatif des températures et activités de l'eau optimales pour la croissance et la production de mycotoxine *in vitro* des principales espèces de *Fusarium* associées à la FHB. Sont indiquées en rouge, dans la colonne « Espèce », les conditions optimales de croissance pour chaque espèce. Les conditions optimales de production de mycotoxines sont indiquées dans les colonnes « Température » et « Activité de l'eau ».

Espèce	Mycotoxine	Température			Activité de l'eau			Milieu de culture	Référence
		Min ¹	Opt ²	Max ³	Min	Opt	Max		
<i>F. avenaceum</i> 20-25 °C, a_w > 0.90	ENN	15	25	30	0.96	0.98	0.99	FDM, jus de grain	Kokkonen et al., 2010; Gautier et al., 2020b
<i>F. graminearum</i> 25-30 °C, a_w = 0.98	DON	5	25	32	0.89	0.99	0.99	Grain, jus de grain	Ryu and Bullerman, 1999; Hope et al., 2005; Kokkonen et al., 2010; Mylona et al., 2012
	ZEA	5	25	32	0.93	0.97	0.99	Grain	Llorens et al., 2004; Mylona et al., 2012
<i>F. langsethiae</i> 20-25 °C, a_w > 0.98	DAS	NA	15	25	0.96	0.99	0.99	Jus de grain	Kokkonen et al., 2010
	T-2	10	20	34	0.93	0.99	0.99	Grain, jus de grain	Medina and Magan, 2011; Kokkonen et al., 2010, 2012; Nazari et al., 2014; Verheecke-Vaessen et al., 2021, 2022
	HT-2	10	20	34	0.93	0.99	0.99		
<i>F. poae</i> 25 °C, a_w > 0.90	NIV	20	25	35	NA	NA	NA	Jus de grain	Nazari et al., 2018
	T-2	ND	25	ND	NA	NA	NA	Richard	Kotsonis and Ellison, 1975
	HT-2	ND	25	ND	NA	NA	NA		
	BEA	15	25	25	0.96	0.96	0.99	Jus de grain	Kokkonen et al., 2010
<i>F. tricinctum</i> 25 °C	ENN	15	25	ND	0.96	0.99	ND	Jus de grain	Kokkonen et al., 2010

¹Valeur minimale testée dans au moins une étude. ²Valeur moyenne optimale calculée entre différentes études. ³Valeur maximale testée dans au moins une étude. NA : facteur abiotique non testé dans la littérature. ND : Valeur identique à l'optimale

3. Écophysiologie des espèces de *Fusarium* en interaction

La FHB est causée par une contamination simultanée par plusieurs espèces de *Fusarium*, se retrouvant ainsi en interaction et donc en compétition pour la colonisation de la même niche écologique. Des études ont été menées sur des mélanges d'espèces fusariennes afin d'observer les potentiels effets environnementaux, interspécifiques et intraspécifiques dans cette interaction. Siou et al. (2015) ont en effet mis en évidence que des souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* étaient plus compétitives que *F. poae* en coculture sur épis de blé. Ces deux espèces se sont en effet montrées plus agressives dans la colonisation de la plante, la sévérité des symptômes étant accrue. Au contraire, *F. verticillioides* ou *F. poae* ont été identifiées comme des espèces moins compétitives et opportunistes, profitant des lésions sur les tissus de l'hôte, causées par une espèce plus agressive comme *F. graminearum*, pour se développer (Picot et al., 2012; Tan et al., 2020).

Cependant, les mécanismes impliqués dans les interactions entre les pathogènes, qui pourraient expliquer ces différences d'agressivité ne sont pas totalement connus. Audenaert et al. (2013) affirment, sur la base de leurs travaux et de la littérature, que le DON est impliqué dans la compétition pour la colonisation de la niche écologique lors de la phase saprophyte de *F. graminearum*. Plus récemment, Beccari et al. (2024) ont confirmé qu'une souche de *F. graminearum* productrice de DON était significativement plus apte à coloniser les différents tissus du blé qu'une souche non productrice. A ce jour, il s'agit du seul rôle identifié des mycotoxines dans l'agressivité des espèces fusariennes, le potentiel rôle des mycotoxines dans la compétition interspécifique n'étant, à nos connaissances, qu'hypothétique. Par exemple, les propriétés antifongiques des fumonisines sur le développement *in vitro* de *F. graminearum* ont été suggérées (Keyser et al., 1999). Cependant, Picot et al. (2012) n'ont pas observé cette propriété inhibitrice des fumonisines produites en faible quantité par *F. verticillioides* en coculture avec *F. graminearum* sur épi de maïs. Ces auteurs ont ainsi suggéré que la capacité de colonisation accrue de *F. verticillioides* n'était probablement pas liée à sa capacité à produire des fumonisines.

Il est également difficile de comprendre à quel moment de l'infection une espèce pourrait prendre le dessus sur une autre, en tenant compte de la composition du pathobiome d'infection, des associations d'espèces, des changements environnementaux constants et des caractéristiques écologiques de chaque espèce.

Par exemple, il a été mis en évidence une association entre *F. poae* et *F. avenaceum* ou *F. graminearum* sur épis de blé récoltés en 2007 et 2008 (Audenaert et al., 2009), soulevant l'hypothèse que *F. poae* serait un pathogène peu virulent, colonisant l'épi de blé dans un second temps (Brennan et al., 2003). Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie avec la présence de *F. graminearum* ou avec les facteurs environnementaux.

Dans cette troisième et dernière partie d'introduction, nous avons soulevé de nombreux facteurs impliqués dans le développement de la FHB. Mais nous avons également démontré la difficulté de les étudier, la contamination par les espèces fusariennes étant impactée par de nombreux facteurs qu'on ne peut ni contrôler, ni prévoir : le climat, la composition du pathobiome d'infection, les relations entre les différentes espèces de *Fusarium* et les mécanismes impliqués dans ces interactions.

Ces informations soulignent la complexité du mécanisme d'infection du blé par *Fusarium*. C'est dans ce contexte que le sujet de thèse a été construit, afin d'établir de possibles facteurs explicatifs entre l'occurrence des espèces et leurs capacités écophysiologiques seules ou en interaction dans le but de mieux comprendre et à terme, potentiellement mieux prédire la FHB.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre d'un projet plus large. Le projet ANR EvoITox (AAPG2020) vise à prédire et anticiper l'évolution des risques associés aux mycotoxines dans les régions de France cultivant le blé, en réponse aux changements climatiques.

Projet de thèse

Ces travaux de thèse visent à comprendre la dynamique des espèces de *Fusarium* ainsi que leur potentiel adaptatif face aux variations environnementales. Il s'agit de tenter d'identifier de nouveaux éléments sur la compréhension de la distribution des espèces et sur la diversité interspécifique et intraspécifique en réponse aux variations environnementales, permettant de mieux anticiper le risque FHB.

L'objectif principal de ces travaux a donc été de définir de potentiels facteurs explicatifs entre le comportement des espèces de *Fusarium* au champ et ce qui résulte des expérimentations *in vitro* au laboratoire.

Pour atteindre cet objectif, deux tâches majeures ont été effectuées (Figure 9).

- 1) La première tâche avait pour objectif de **caractériser l'évolution des profils des espèces fusariennes face aux changements climatiques en cherchant à répondre à la question suivante : quelle est l'évolution de la distribution des espèces de *Fusarium* au champ sur les 15 dernières années ?**

Pour ce faire, nous disposions d'un large panel d'échantillons récoltés par Arvalis sur blé français entre 2007 et 2022. Une approche de métabarcoding a été utilisée pour identifier les espèces fusariennes dans les échantillons. En parallèle, les mycotoxines ont été quantifiées dans ces mêmes échantillons. Nous disposions d'une large base de données, regroupant des variables temporelles, spatiales, agronomiques et climatiques. Les résultats associés sont présentés dans le Chapitre 1.

- 2) Pour la seconde tâche, nous avons cherché à **mettre en évidence les caractéristiques écophysiologiques des espèces fusariennes sous contraintes abiotiques. La question que nous nous poserons tout au long de ce chapitre est la suivante : quelles sont les réponses des espèces de *Fusarium* face à différentes pressions abiotiques ?**

Pour ce faire, nous avons étudié les capacités de croissance et de production de mycotoxines des espèces fusariennes majoritaires sous contraintes abiotiques. Nous disposions de cinq souches pour cinq espèces de *Fusarium*, présentes dans la collection du laboratoire MycSA. Afin d'apporter de nouvelles connaissances à ce sujet, nous avons étudié les espèces en culture individuelle (monoculture) et

également en culture deux à deux (cocultures). Les résultats sont respectivement présentés dans les parties 1 et 2 du chapitre 2.

Ce manuscrit se terminera par une discussion générale reprenant les principaux résultats présentés dans les deux chapitres afin de définir de possible facteurs explicatifs entre les données observées au champ et celles obtenues au laboratoire. Cette discussion permettra également d'aborder les perspectives de ces travaux de thèse.

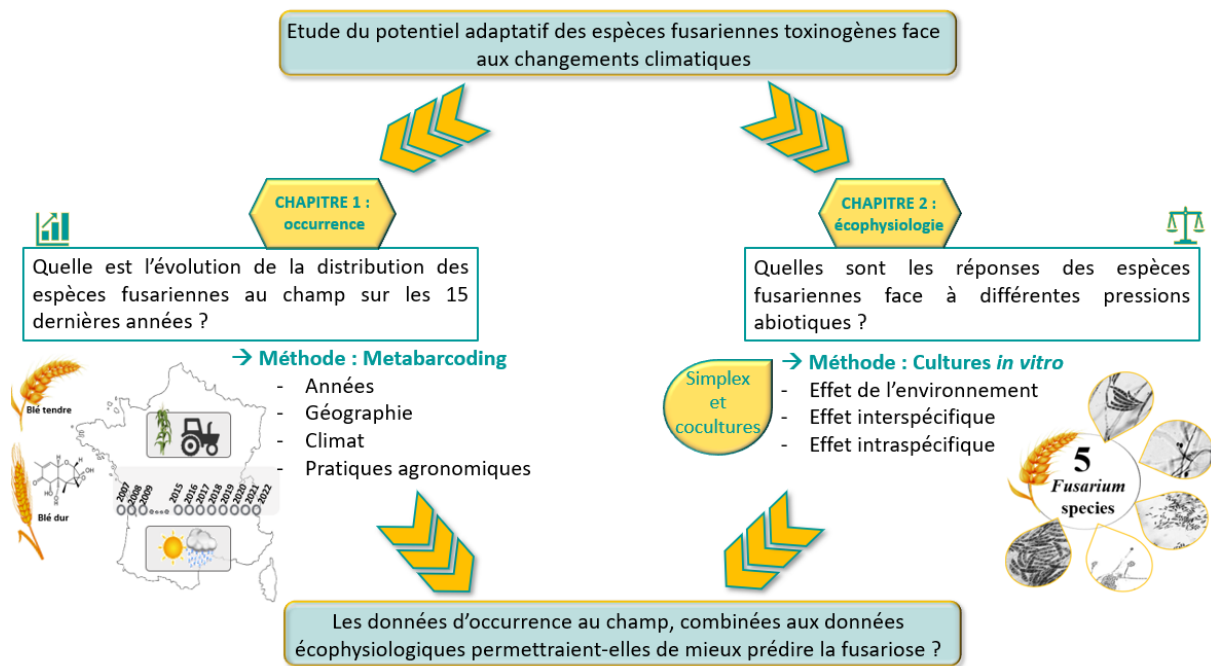


Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'organisation des travaux de thèse.

CHAPITRE 1 : ÉVOLUTION DE LA DISTRIBUTION DES ESPÈCES FUSARIENNES INFECTANT LES BLÉS EN FRANCE ENTRE 2007 ET 2022

Objectifs du chapitre 1

Dans ce premier chapitre, nous traiterons de **l'évolution des profils des communautés fusariennes en lien avec les changements climatiques en cherchant à répondre à la question suivante : quelle est l'évolution de la distribution des espèces de *Fusarium* au champ sur les 15 dernières années ?**

Pour ce faire, nous disposons de 1 273 échantillons de grains de blé, récoltés par Arvalis entre 2007 et 2022 en France. Une approche de métabarcoding a été utilisée dans le but d'identifier la présence et la répartition des différentes espèces fusariennes dans les échantillons. Les mycotoxines ont également été quantifiées dans ces échantillons. Nous disposons d'une large base de données, regroupant des variables temporelles, spatiales, agronomiques et climatiques dans le but d'étudier l'existence de relations entre la représentativité des espèces fusariennes et les différents facteurs environnementaux.

Dans ce manuscrit, nous avons fait le choix de cibler notre analyse afin d'étudier l'effet de quelques facteurs sur la distribution des espèces fusariennes et des profils de mycotoxines associées. Nous avons sélectionné les variables suivantes : année, plante hôte (blé tendre ou blé dur) et climatique (température et pluviométrie).

Introduction

1. Principe général du métabarcoding

L'étude des communautés d'organismes vivants, comme les bactéries ou les champignons, est une pratique courante et indispensable dans la compréhension de l'évolution des espèces dans un écosystème. Les approches culturelles classiques consistent à isoler des souches microbiennes à partir d'un échantillon d'intérêt. La souche peut ensuite être étudiée de manière détaillée au laboratoire. Ces approches peuvent être difficiles à mettre en œuvre car elles nécessitent un travail fastidieux pour réaliser les isollements et les cultures, et elles ne permettent d'accéder qu'à la diversité dite « cultivable ». Plus récemment, l'utilisation de méthodes à haut débit (culturomique) a permis de contourner partiellement ces limitations. Des travaux ont ainsi identifié, par séquençage, différentes espèces associées aux plantes après culture des organismes isolés à partir d'un échantillon environnemental (Boutigny et al., 2014; Barret et al., 2015; Truyens et al., 2015; Bertani et al., 2016; Tzec-Interián et al., 2020).

Ces dernières années, le développement des techniques de biologie moléculaire, et notamment de séquençage à haut débit (NGS) a révolutionné l'étude de la composition des communautés microbiennes au sein des écosystèmes (Mardis, 2008; Garcia-Cela et al., 2018; Jagadeesan et al., 2019).

La métagénomique ciblée (métabarcoding) est une technique NGS faisant l'inventaire des microorganismes composant une communauté dans un échantillon environnemental. Sa représentation schématique est reportée en Figure 1. C'est une méthode qui permet d'identifier, en un seul point d'analyse, les différentes espèces présentes dans l'échantillon par séquençage haut débit après amplification par PCR, des marqueurs génétiques spécifiques aux communautés à mettre en évidence (généralement les gènes de l'ARNr 16S pour les procaryotes, de l'ARNr 18S pour les eucaryotes et l'ITS [Internal Transcribed Spacer] pour les champignons). Le métabarcoding est couramment utilisé sur les échantillons de sols, d'eau ou de diverses parties des plantes (tiges, grains, racines), mettant en évidence la complexité dans la composition des communautés de microorganismes (Marčiulyrienė et al., 2021; Meyneng et al., 2024; Rineau et al., 2024).

Différents outils de séquençage et de traitement des données sont actuellement disponibles, chacun présentant ses avantages et inconvénients (Figure 1 ; Schloss et al., 2009; Caporaso et al., 2010; Escudié et al., 2018; Falentin et al., 2019). Par exemple la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux (PGTB) propose aujourd’hui des prestations de métabarcoding sur le séquenceur NextSeq 2000 ou GridION. Les pipelines d’analyse FROGS et QIIME2 sont le plus souvent utilisés par la communauté scientifique, en raison de leurs mises à jour régulières et leurs capacités à traiter d’importants jeux de données comportant plusieurs millions de séquences.

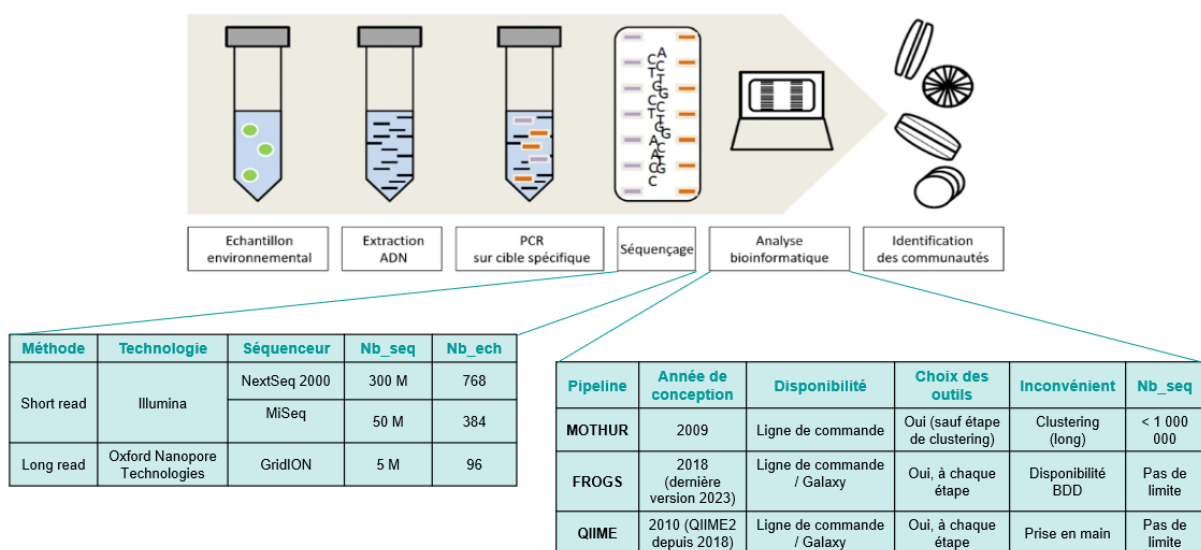


Figure 1 : Représentation schématique du déroulement de la méthode NGS de métagénomique ciblée (adaptée de <https://pgtb.fr/la-metagenomique-ciblee/>). Les tableaux en bleu récapitulent les différents choix actuels qui s’offrent aux utilisateurs en termes d’outils de séquençage (Tableau de gauche où Nb_seq indique le nombre maximal de données produites et Nb_ech le nombre maximal d’échantillons à traiter par run de séquençage) et de traitement bio-informatique des données (Tableau de droite où Nb_seq indique la taille maximale, supportée par le logiciel, du jeu de données, en nombre de séquence).

Les séquences obtenues à l’issue du métabarcoding ne peuvent pas prétendre à une assignation taxonomique directe (Falentin et al., 2019). Ainsi, il est indispensable d’avoir recourt à une méthode de regroupement (ou de clustering) des séquences similaires au sein de mêmes groupes taxonomiques.

Deux méthodes de clustering sont utilisables sur les données de métabarcoding :

- i) Regroupement sous forme d’unités taxonomiques opérationnelles (OTU pour « Operational Taxonomic Unit » ; Moyer et al., 1994) qui aligne et compare les séquences identifiées dans les échantillons pour exprimer un

pourcentage de similarité ou de divergence entre deux séquences. Ainsi, les séquences avec un pourcentage de divergence inférieur à un seuil fixé par les utilisateurs (généralement 97%, pour un maximum de précision ; Kim et al., 2014) sont regroupées au sein d'un même OTU. Ce regroupement tient compte des erreurs de séquençage et d'amplification.

- ii) Regroupement sous forme de variants de la séquence d'amplicon (ASV pour « Amplicon Sequence Variants » ; Callahan et al., 2017) qui détecte les petites variations biologiques en appliquant une correction du bruit introduit dans les séquences (par des erreurs techniques lors de la préparation des bibliothèques ou du séquençage), tout en prenant en compte l'abondance et les similarités des séquences (Callahan et al., 2016). En effet, cette méthode regroupe initialement toutes les séquences identifiées dans les échantillons pour comparer ensuite leur diversité avec la diversité attendue, qui serait uniquement due aux erreurs techniques, jusqu'à l'obtention de groupes homogènes.

Récemment, les études de métabarcoding se sont tournées vers l'utilisation des ASV, ayant montré des analyses plus fines en termes de richesse et de diversité. Les ASV permettent de discriminer des séquences à un nucléotide près (McKnight et al., 2019; Pauvert et al., 2019), ce qui s'avère être indispensable dans la différenciation des espèces fusariennes.

Enfin, il est à noter que l'approche de métabarcoding génère des abondances taxonomiques relatives, qui ne permettent pas une quantification absolue des espèces présentes au sein de la communauté microbienne. En effet, le nombre de copie de gènes est souvent variable en fonction des organismes étudiés (ARNr 16S ou 18S, ITS). Certaines copies de gènes peuvent être retrouvées dans différents génomes et des biais techniques peuvent être introduits aux différentes étapes, de la préparation des bibliothèques jusqu'au séquençage, en passant par l'enzyme polymérase qui peut-être plus spécifique à l'amplification de certaines espèces lors de la PCR (Falentin et al., 2019).

2. Le métabarcoding chez *Fusarium*

Les amorces universelles des champignons ciblent la région ITS du ribosome nucléaire, permettant de discriminer les différents genres fongiques (Schoch et al., 2012). Cependant, cette cible n'est pas suffisamment résolutive pour discriminer les espèces de *Fusarium* entre elles (Geiser et al., 2004). Ainsi, le gène du facteur d'élongation de la traduction (gène EF1 α) a été décrit comme spécifique dans la discrimination des espèces de *Fusarium* (O'Donnell et al., 2000). En effet, ce gène EF1 α est présent en monocopie dans le génome des espèces (Geiser et al., 2004), ce qui facilite les comparaisons quantitatives entre les espèces qui présentent une variabilité suffisante sur ce gène. Ceci peut permettre une classification taxonomique fine, jusqu'à une paire de base près (Al-Hatmi et al., 2016; Karlsson et al., 2016). L'utilisation des méthodes NGS pour l'étude de la diversité des communautés fusariennes est longtemps restée limitée en raison du manque d'amorces spécifiques. Récemment, diverses études ont été menées et ont validé l'utilisation de couples d'amorces ciblant des régions légèrement différentes sur le gène EF1 α (Figure 2 ; Karlsson et al., 2016; Boutigny et al., 2019; Cobo-Díaz et al., 2019b).

```
AATCTCCTTCTCCCACCACTTCCCTTTAATTTTTCTTCCCTTCCCTCCTCGTCTCGCATACCCGGTTCAAGCATCCGATCTGCGAATCTGTACGTACGACCCCT
CAGGGCTTTGTAGAAGGATATCATCAAGATCATTGCTTCATTGCAACTATCCTGCTTGGTATTTCATCGTCCGCTGCTCATCGCACCATCAGCTTCAGCAGCT
AACCATCTCACAGCAGTTCATCACAAACGTACACACAAACCATCCACAACCGTCAAAATGGGTAAGGAGGAGAAGACTCACCTTAACGTCTCGTCCATCATCGGG
CACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACCACCGCATCCCAACCCCGCGGACACTTGGCGGGGTAGTTTCAAATTTCCAATGTGCTGACATCTTG
ATAGA CCGGTCACCTTGATCTACCAAGTCCGGTGGTATCGACAAGCGAACCCATCGAGAAGTTCCGAGAAAGTTGGTCTCATTTTCCGATCGCGGCCCTTTCC
CITTCGAAATATCATTGCAATCGCCCTCACACGACGACTCGATACGCGCCTGTACCCCGCTCGAGGTCAAAAATTTTTCGGGCTTTGTCGTAATTTTTTCCCG
GTGGGGCTCATACCCCGCCACTCGAGCGACAGGCGCTCGCCCTTCCACAAACCATTCCCTGGGCGCTCATCATCACGTGTCAACCAGTCACTAACCACC
TGTC AATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTCAAGTACGCGCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCG
CCCTCTGGAAGTTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCAITGGTATGTTGTCACCACTGCTGTCATCACATTCTCATACTAACATGGGTATCAGACGCTCCC
GGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCAGGCCGATTGCGCCATTCTCATCATTGCGCCGGTAC TGGTGAGTTTCGAGGCTGGTATCT
CCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAGCTCTCCTTGCCTACACCCCTGGTGTCAAGAACCTCATTGTTGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTG
AGGCCCGTTACCAGGAGATCATCAAGGAGACCTCTTCTTTCATCAAGAAGGTGGCTACAACCCCAAGGCTGTCGCTTTTCGTCGCCATCTCCGGTTTCAACGG
TGACAACATGCTTACTGCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGCGTGAGATCAAGTCTGGCAAGCTCTCCGAAAGACCCCTCTTGAGGCCAT
TGACTCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCAACGACAAGCCCTCCGACTTCCCTCCAGGATGCTACAAGATTGGCGGTATTGGAACGGTTCCTGTCGGCCG
TATCGAGACTGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCTGTACCTTCGCTCCTTCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTTGAGATGCACCACGAGCAGCTCACT
GAGGGACAGCCCGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTC AAGGACATCCGACGTGGTAAACGTCGCTGGTACTCCAAGAACGACCCCCC
CATGGGTGCCGCTTCTTACCCGCCAGGTTCATCGTCTCAACCACCCCGGTAGGTCGGTCTGTTTACGCTCCCGTCTCGATTGCCACACTGCCACAT
TGCTGCAAGTTCCGCCGAGATCCAGGAGAAGATCGACCCGCAACCCGTAAGGCTACTGAGGCCGCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTACTCCGCCATCG
TCAAGATGGTTCCCTCCAAGCCCATGTGTGTTGAGGCTTTCACCGACTACCCCTCCTCTGGGTGTTTCCGCGTCCGTGACATGCGACAGACCCGTCGCCGTCG
GTGTCATCAAGGCCGTCGAGAAGTCCACTGGCGCTGCTGGCAAGGTACCAAGTCCGCTGCCAAGGCTGGTAAGAAATAAGCGCATTATTTCTGAAATGACA
ACCTTCGGTGGGATCTTACGACTCTGGTCTCAGCCCAAGGGCTGATGACTCGCTTCTACGACGAAATGATCATGTTGGCATGAGCACTCGGCTTATGTCTG
GGGCACGAGATGAGGCGAAAATAAAGCCTGGGATCTTGTGCAATCAAAAATAGGAATAGAGAGTCTAGAAGTGATTTCGTCGAATTTTTCTTGTCCCTATG
CTACCTGTGATGCACTGTGACTTGCA
```

Figure 2 : Positionnement de deux couples d'amorces utilisés pour caractériser les communautés de *Fusarium* par méthode NGS. Le positionnement des amorces décrites dans Boutigny et al., 2019 (EF1-F2 et EF1-R3, en rose) et dans Cobo-Díaz et al., 2019b (Fa-150 et Ra-2, en vert) est représenté sur la séquence du gène EF1 α de la souche PH1 (souche de référence de *F. graminearum*). La région du gène commune à toutes les espèces est indiquée en gras tandis que la région hypervariable est soulignée.

Dans le cadre de ces travaux, l'approche de métagénomique ciblée a été utilisée afin de caractériser la diversité des communautés fusariennes dans 1 273 échantillons de grains de blé, récoltés par Arvalis entre 2007 et 2022 en France. Les mycotoxines ont également été quantifiées dans ces échantillons. À notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel nombre d'échantillons récoltés sur un tel nombre d'années a été traité, permettant l'étude simultanée des contaminations par les espèces fusariennes et les mycotoxines associées.

Matériel et méthodes

1. Échantillons fongiques

Préparation du Mock. Un témoin positif, aussi appelé « Mock », a été préparé pour valider la spécificité des amorces de PCR, l'efficacité des réactions de PCR ainsi que la reproductibilité de la méthode entre les différents runs de séquençage et la robustesse du pipeline d'analyse bio-informatique.

Le Mock a été préparé en mélangeant, de façon équimolaire, l'ADN génomique de 11 espèces de *Fusarium* (Tableau 1) issues de la collection de MycSA. L'assignation taxonomique de chaque espèce a été vérifiée par séquençage Sanger du gène EF1 α .

Tableau 1 : Liste des souches de *Fusarium* utilisées pour la composition des Mock.

Espèce	Souche	Fournisseur
<i>F. graminearum</i>	I837	CBS 123657
<i>F. culmorum</i>	I818	CBS 417.86
<i>F. poae</i>	I73	CBS 317.73
<i>F. sporotrichioides</i>	I101	
<i>F. langsethiae</i>	I509	
<i>F. avenaceum</i>	I873	Canadian Collection of fungal cultures (FaLH27)
<i>F. tricinctum</i>	I104	
<i>F. verticillioides</i>	I63	
<i>F. subglutinans</i>	I85 *	
<i>F. proliferatum</i>	I79 *	CBS 186.56
<i>F. temperatum</i>	I597	

*assignations des souches non validées par BLASTn (voir paragraphe « Mise au point des assignations au rang de l'espèce de *Fusarium* », pages 56-58), ne seront pas attendues dans les résultats des Mock.

Échantillons environnementaux. Entre 2007 et 2022, Arvalis a mené des campagnes de récoltes d'échantillons de blé tendre et de blé dur en France. Au total, 1 273 échantillons ont été sélectionnés pour l'analyse métabarcoding (Annexe 1). Une large base de données regroupant toutes les métadonnées associées (localisation, variété de blé, données climatiques, pratiques agricoles) a été construite par Arvalis pour l'ensemble des échantillons. Les grains de blé récoltés ont ensuite été broyés en farine (particules de 5 μ m) à l'aide du MM400 Retsh mixer mill (Retsh, Allemagne) pour les futures extractions de mycotoxines et d'ADN.

Échantillons d'ADN. Les ADN des échantillons de 2014, 2015 et 2016, initialement extraits dans le cadre d'un projet Ecophyto (2012-2015), le projet PYROFUS, ont été fournis par Arvalis.

2. Méthodes pour l'étude des mycotoxines

Extraction de mycotoxines. Les mycotoxines ont été extraites des échantillons environnementaux à partir de 4 g de farine de blé auxquels ont été ajoutés 7,5 mL d'une mélange eau ultrapure/acide acétique (0,1 %, v/v) et 10 mL d'acétonitrile, puis la suspension a été homogénéisée pendant 5 min. La séparation des phases a été assurée par l'ajout de 4 g de $MgSO_4$ et 1 g de NaCl et les échantillons ont ensuite été homogénéisés pendant 3 min puis centrifugés pendant 5 min à 4800 g, à température ambiante. Enfin, 500 μ L de la phase supérieure ont été prélevés pour chaque échantillon et dilués dans 500 μ L d'eau ultrapure avant d'être filtrés à l'aide d'un filtre seringue (Acrodisc 13 mm mini spike with 0.2 μ m ; VWR International, Puerto Rico). Les extraits ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur quantification.

Quantification des mycotoxines. La quantification des mycotoxines (DON, ADON, DAS, T-2, HT-2, ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1, BEA, NIV, FX, et ZEA) a été réalisée en chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS), comme décrit dans la partie « Mycotoxins Analysis » du chapitre 2 (pages 110-111), à l'exception de la limite de quantification (QL) des ENN qui a été définie à 25 ng.g⁻¹. Les mycotoxines ont été exprimées en ng de mycotoxines quantifiées par g de farine.

3. Méthodes pour l'étude des communautés fusariennes

Extraction d'ADN du Mock. L'ADN fongique a été obtenu à partir des mycéliums lyophilisés après 7 jours de culture sur milieu solide Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, Le-Pont-de-Claix, France). Un protocole d'extraction au Sarkosyl a été utilisé pour extraire l'ADN (Annexe 2).

L'ADN a été quantifié par un dosage fluorimétrique (Quantifluor One dsDNA kit, Promega, USA) selon les instructions du fournisseur puis sa qualité a été vérifiée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

Extraction d'ADN des échantillons environnementaux. L'ADN total a été extrait des farines de blé en utilisant un kit d'extraction DNeasy 96 Plant kit (Qiagen, France). Les recommandations du fournisseur ont été suivies en appliquant les modifications suivantes : 50 mg de farine ont été pesés et 5 µL de protéinase K (ThermoScientific, Vilnius, Lituanie) ont été ajoutés au tampon de lyse. Chaque échantillon a été re suspendu dans 100 µL d'eau DNase-RNase free puis l'ADN a été quantifié par dosage fluorimétrique (Invitrogen, USA). Un blanc d'extraction a également été réalisé afin d'identifier de potentielles contaminations lors de l'extraction d'ADN.

Amplification PCR et Séquençage Illumina. Le couple de primer EF1-F2 (forward) et EF1-R3 (reverse), décrit dans Boutigny et al. (2019), a été utilisé pour l'amplification du gène EF1 α . Selon le protocole de la Plateforme Génomique Transcriptome de Bordeaux (PGTB), les adaptateurs suivants ont été ajoutés en position 5' des amorces forward et reverse, respectivement : 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG 3' et 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG 3'.

La première série de réaction de PCR (PCR1) contenait 1 X de Master Mix Type-it pour PCR Multiplex, 0.5 X de Q-solution (Type-it Microsatellite PCR Kit, Qiagen, France) et 0.25 µM de chaque primer, dans un volume total de 25 µL. Les réactions de PCR1 ont été réalisées avec 60 ng d'ADN du Mock ou avec 125 ng d'ADN environnemental. Des blancs de PCR (H₂O qualité biologie moléculaire) ont été utilisés comme témoins négatifs pour identifier de potentielles contaminations lors des PCR. Les amplifications ont été réalisées sur un thermocycleur Applied Biosystems 96-Well selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale de 12 min à 95 °C ; suivie de 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, hybridation à 65 °C pendant 1 min et élongation à 72 °C pendant 1 min ; puis une étape finale d'élongation de 10 min à 72 °C. La qualité des produits d'amplification a ensuite été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %, la taille attendue du produit d'amplification finale étant de 750 pb. Les produits de PCR1 ont ensuite été purifiés sur billes magnétiques SPRI selon le protocole de la PGTB en utilisant le robot Hamilton chemagicSTAR. L'étape d'indexage a été réalisée lors de la deuxième série de réactions de PCR (PCR2) contenant 1 X de Mix de la Polymerase Solis et 1 µM d'Index Nextera (PGTB). Le cycle de PCR suivant a été réalisé sur un thermocycleur Applied Biosystems 96-

Well : 15 min à 95 °C suivies de 12 cycles à 95 °C pendant 30 s, 60 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s, avec une étape finale d'élongation de 5 min à 72 °C. Les produits d'amplification indexés ont ensuite été quantifiés en fluorimétrie (Quant-it Kit, Invitrogen, USA) sur un lecteur de plaque (Agilent Biotek Microplate Reader) avant d'être dilués à une concentration finale de 7 ng.µL⁻¹. Enfin, les échantillons ont été mélangés par lots de 4 plaques de 96 échantillons. La taille des bibliothèques d'ADN ainsi obtenues a été contrôlée en TapeStation (High Sensitivity D5000 ScreenTape, Agilent Technologies). Une purification par taille a été réalisée sur une cassette 1.5 % DF Marker K adaptée au Pippin Prep (Sage Science) afin de conserver uniquement les bibliothèques de la bonne taille (750 pb). Le séquençage a ensuite été réalisé sur le NextSeq 2000 (Illumina), sur une cassette P1 600 cycles (2 x 300pb). Au total, quatre runs de séquençage ont été réalisés.

Traitement des données de séquençage. Les données brutes de sortie de séquençage ont d'abord été analysées avec FastQC. Pour les quatre runs de séquençage, les séquences reverse se sont avérées de moins bonne qualité que les forward. Ainsi, pour la suite des analyses, seules les séquences forward ont été traitées à l'aide de QIIME2 v2023.7 (Bolyen et al., 2019) et de DADA2 (Callahan et al., 2016). Tout d'abord, les séquences ont été nettoyées avec les paramètres par défaut, à l'exception des critères suivants : *i*) les séquences ont été tronquées après les 290 premières paires de bases (pb), la qualité des séquences chutant pour les pb suivantes ; *ii*) les 20 premières pb, correspondant aux séquences des amorces, ont été supprimées ; *iii*) les séquences dont le nombre d'erreurs attendues était supérieur à 0.5 % ont été rejetées et *iv*) toutes les séquences ont été regroupées avant la détection et la suppression des chimères. Les séquences ainsi filtrées ont ensuite été comparées à la base de données de séquences de taxonomie connue, générée pour cette étude (inspirée de Boutigny et al., 2019 et Cobo-Díaz et al., 2019b ; voir partie « Mise au point des assignations au rang de l'espèce de *Fusarium* », pages 56-58; Annexe 3), pour finalement être assignées par un classificateur (sklearn) dans QIIME2. Les tables d'ASV et de taxonomie ainsi obtenues pour les 4 runs de séquençage ont été fusionnées avec le package « phyloseq » (version 1.38.0) sur R (version 4.1.0). Les ASV présents dans au moins un échantillon ont été conservés. Seuls les ASV assignés au genre *Fusarium* ont été étudiés (20% du jeu de données).

4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec R (version 4.1.0). Les analyses de diversité (alpha) des communautés ont été réalisées avec les packages « phyloseq », « vegan » et « microbiome ». L'influence de facteurs qualitatifs (année, plante hôte) sur la structure des communautés (diversité beta) a été étudiée par une analyse de variance multivariée permutacionnelle (PERMANOVA) sur les distances de Bray-Curtis à l'aide de la fonction *adonis2* du package « vegan ». Les indices de corrélations de Pearson et les *p-values* associées (fonctions *cor* et *cor.mtest* des packages « stats » et « corrplot ») ont été calculés sur les proportions relatives corrigées (fonction *clr* du package « compositions ») de chaque espèce ainsi que sur les quantités des mycotoxines, respectivement. Deux facteurs climatiques (somme des pluies et des températures moyennes à 7 jours autour de la floraison) ont été sélectionnés pour tester leur influence, via les corrélations de Pearson, sur les mycotoxines produites. Les comparaisons de moyennes et les différents tests de significativité ont été réalisés par des analyses de variances (ANOVA) suivies d'un test post hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Mise au point de la méthode

1. Transférabilité de l'outil et méthode d'analyse

Dans le cadre de notre étude de métabarcoding, nous avons collaboré avec l'équipe BIOGER de l'INRAE, qui a été partenaire du projet PYROFUS (2013-2016). L'objectif de ce projet était de développer un outil moléculaire innovant, basé sur les technologies NGS, pour la caractérisation des espèces fusariennes associées à la FHB sur blé (Boutigny et al., 2019).

Afin de traiter un large jeu de données balayant les 15 dernières années, l'objectif de mes travaux de thèse était d'analyser des échantillons de blés récoltés entre 2014 et 2022 et de combiner ces résultats avec les données obtenues dans le cadre du projet PYROFUS, sur des échantillons récoltés entre 2007 et 2013.

Ainsi, pour que les résultats obtenus entre les deux projets soient comparables, nous avons d'abord cherché à transférer la méthode décrite dans Boutigny et al. (2019). Cependant, le transfert de méthode NGS de métagénomique ciblée peut s'avérer complexe. En effet, de nombreux biais techniques et biologiques peuvent être introduits, de la préparation des librairies jusqu'au traitement bio-informatique des données, en passant par le séquençage (choix du kit d'extraction d'ADN, choix des amorces, contaminations, erreurs d'amplification, choix du séquenceur, erreurs de séquençage, choix des outils bio-informatiques, base de données de référence ; Falentin et al., 2019).

Nous nous sommes dans un premier temps placé dans les mêmes conditions que celles utilisées dans Boutigny et al. (2019) (même kit d'extraction d'ADN, amorces EF1-F2 / EF1-R3, conditions de PCR). Dans le cadre de ma thèse, j'ai réalisé toutes les étapes de construction des banques à la PGTB, où a également été réalisé le séquençage, alors que la plateforme de Génome et Transcriptome de Toulouse (GeT Genotoul) avait été ciblée pour le projet PYROFUS. Les méthodes et outils de séquençage de ces deux plateformes n'étant pas les mêmes, nous avons été confrontés à des difficultés dans le transfert de la méthode. En effet, nous avons initialement ciblé le MiSeq d'Illumina comme outil de séquençage pour mes données, comme décrit dans Boutigny et al. (2019). Cependant, suite à des problèmes techniques, nous avons finalement séquencé nos échantillons sur le NextSeq 2000, produisant beaucoup plus de données que le MiSeq (voir tableau de droite de la Figure

1, page 42). Ainsi, notre jeu de données en sortie de séquençage de chaque run comportait un nombre trop important de séquences pouvant être analysées (Tableau 2) avec le pipeline décrit dans Boutigny et al. (2019), nous obligeant à changer également d'outils bio-informatique de traitement des données (voir tableau de gauche de la Figure 1, page 42).

2. Validation de la méthode en interne

Au total, quatre runs de séquençage, composés de quatre plaques chacun, ont été réalisés. Au sein de chaque run, différents échantillons contrôles ont été introduits afin de valider la méthode en interne (Tableau 2) : des témoins négatifs de PCR (H₂O) et un témoin d'extraction d'ADN (H₂O_EX), un échantillon environnemental contrôlé inter-run répété à chaque run de séquençage, des échantillons environnementaux en triplicatas et des échantillons positifs, de composition connue, appelés Mock.

Tableau 2 : Echantillons contrôles au sein des différents runs de séquençage. Sont indiqués pour chaque run : le nombre de plaque (Nb_plaque), le nombre d'échantillons traités (Nb_ech), le nombre de séquence en sortie de séquençage (Nb_Seq), le nombre de contrôles négatifs (Nb_H₂O), le nombre d'échantillons analysés en triplicatas (Nb_rep), le nombre d'échantillons traités comme contrôles entre les différents runs (Nb_Ct) et le nombre de contrôles positifs, aussi appelés Mock (Nb_Mock). Le nombre total de séquences obtenues pour chaque condition en sortie de séquençage est indiqué sur la dernière ligne (TOTAL_SEQ).

Run	Nb_plaque	Nb_ech	Nb_seq	Nb_H ₂ O	Nb_rep	Nb_Ct	Nb_Mock
1	4	384	79 763 899	4	54	6	12
2	4	384	83 297 339	4	0	4	12
3	4	384	77 388 214	5*	0	2	12
4	3	237	25 633 845	3	0	4	8
TOTAL_SEQ			266 083 297	330 195	10 495 019	3 135 531	6 575 785

* Le cinquième H₂O est un témoin d'extraction (ADN extrait à partir d'eau)

2.1. Reproductibilité de la méthode entre les différents runs de séquençage

Des témoins négatifs de PCR (H₂O) ont été introduits sur chaque plaque de séquençage afin de s'assurer qu'aucune contamination n'ait eu lieu pendant la préparation des bibliothèques. Ces témoins ont été traités exactement de la même façon que tous les autres échantillons, à la différence qu'ici, l'ADN était remplacé par de l'eau

qualité biologie moléculaire pour la PCR1. L'échantillon H2O_EX correspond à un témoin d'extraction, étudié afin de mettre en évidence un potentiel effet du kit d'extraction d'ADN sur les résultats finaux. Après migration par électrophorèse, aucune bande n'a été observée sur le gel, témoignant qu'aucune espèce fusarienne n'a été identifiée dans nos contrôles négatifs. Nous avons ainsi validé la qualité de nos expérimentations.

Ces témoins négatifs ainsi qu'un échantillon contrôle, répétés sur tous les runs, ont également été traités afin de valider la reproductibilité de la méthode entre les différents runs de séquençage et de pouvoir fusionner les données obtenues à partir des quatre séquençages différents.

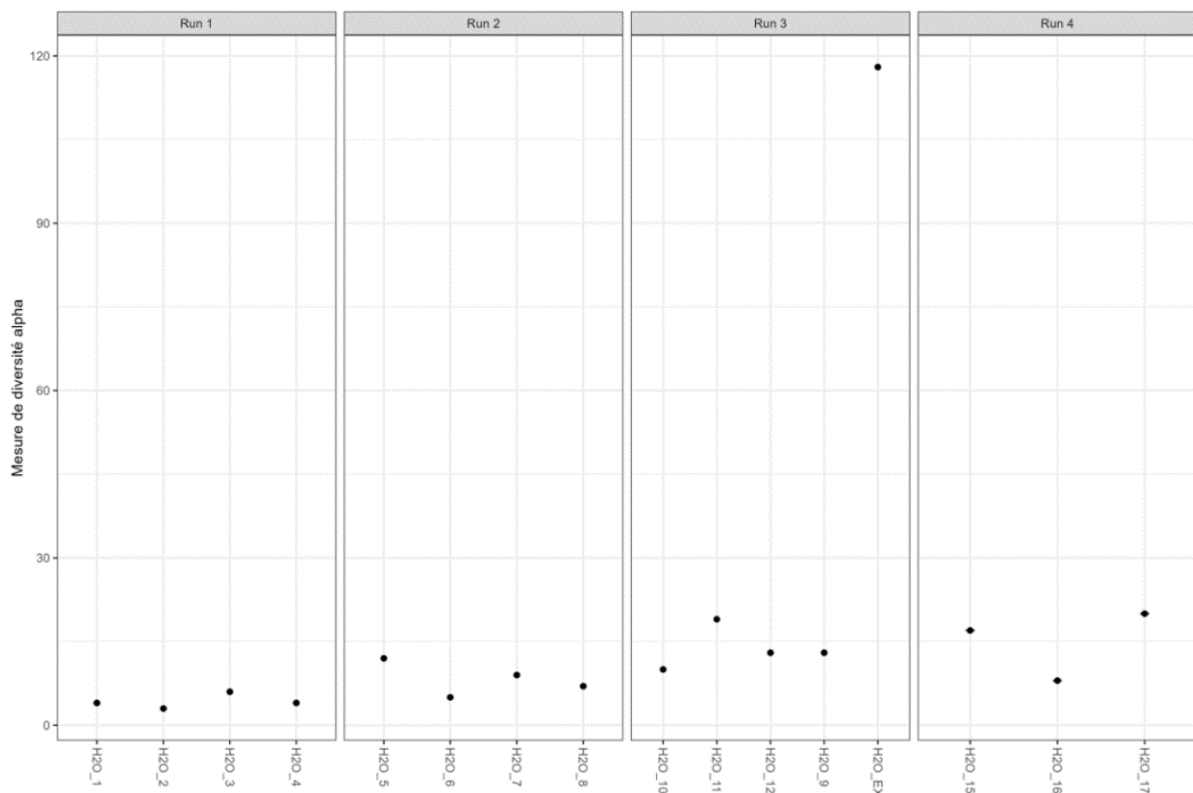


Figure 3 : Nombre d'ASV identifiés dans les contrôles négatifs. La mesure de la richesse observée (axe des ordonnées) est indiquée pour chaque contrôle négatif (axe des abscisses). Les échantillons sont regroupés en fonction du run sur lequel ils ont été séquençés (en colonne). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents runs de séquençage (ANOVA, p -value >0.05). L'échantillon H2O_EX est un témoin d'extraction.

Dans les quatre runs de séquençage, 330 195 séquences ont été identifiées dans les contrôles négatifs. Après les différentes étapes de filtration, 159 ASV ont été identifiés, représentant 57 562 séquences. L'étude de la richesse observée dans les contrôles négatifs a confirmé que peu d'ASV ont été retrouvés dans ces échantillons (16.7 ASV en moyenne par contrôle ; Figure 3) et aucune différence significative n'a été observée

entre les différents runs de séquençage ($p\text{-value} > 0.05$). Ces séquences inattendues peuvent survenir après des contaminations lors de la préparation des bibliothèques, des biais de PCR ou encore des biais dans le traitement bio-informatique des données (Nelson et al., 2014; Falentin et al., 2019). Nous avons également mis en évidence que plus d'ASV ont été identifiés dans le témoin d'extraction (118 ASV pour l'échantillon H2O_EX ; Figure 3), suggérant un effet du kit d'extraction d'ADN sur l'amplification par PCR (Mohammadi et al., 2005; Olomu et al., 2020). Cependant, les ASV identifiés dans les contrôles négatifs ne représentaient que 0.12 % du nombre de séquences dans le jeu de données complet, sur les quatre runs réunis, leur présence a donc été considérée comme négligeable pour la suite des analyses.

Concernant l'échantillon contrôle inter-run de séquençage, 3 135 531 séquences ont été identifiées au total et 472 065 ont été conservées après les différentes étapes de filtration, permettant l'identification de 405 ASV (Figure 4).

De même que précédemment, les analyses des indices de diversité n'ont pas révélé de différence significative ($p\text{-value} > 0.05$) entre cet échantillon répété sur les quatre runs de séquençage.

Le traitement des données concernant les témoins négatifs et le contrôle inter-run a confirmé la reproductibilité de la méthode de séquençage.

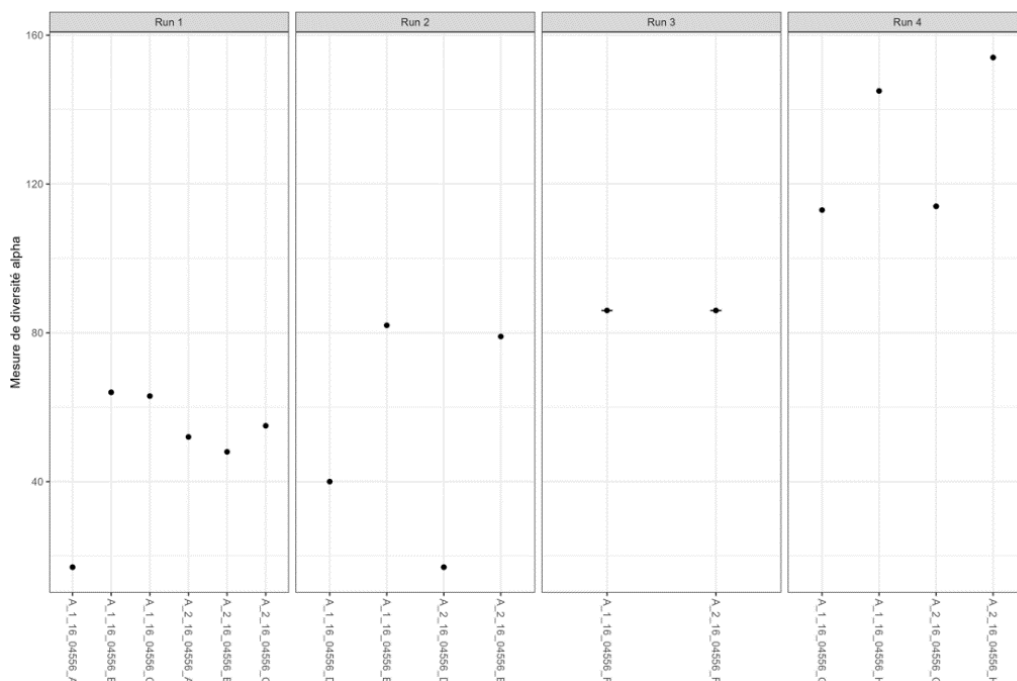


Figure 4 : Nombre d'ASV identifiés dans les contrôles inter-run de séquençage. La mesure de la richesse observée (axe des ordonnées) est indiquée pour chaque contrôle (axe des abscisses). Les échantillons sont regroupés en fonction du run sur lequel ils ont été séquençés (en colonne). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents runs de séquençage ($p\text{-value} > 0.05$).

2.2. Reproductibilité de la méthode entre différents laboratoires

Au total, 16 échantillons ont été traités en répliques afin de valider la reproductibilité de la méthode entre les laboratoires, de la préparation des bibliothèques jusqu'au traitement bio-informatique des données. Pour ce faire, nous avons réalisé des triplicats (54 échantillons au total) sur huit échantillons environnementaux (ADN extrait à partir de farine de blé) pour lesquels nous disposons également des ADN (extraits à partir de farine de blé, avec le même protocole) du projet PYROFUS.

Au total, 10 495 019 séquences ont été identifiées dans les répliques et 659 333 ont été conservées après les différentes étapes de filtration, permettant l'identification de 651 ASV. La richesse observée au sein de ces répliques est représentée sur la Figure 5.

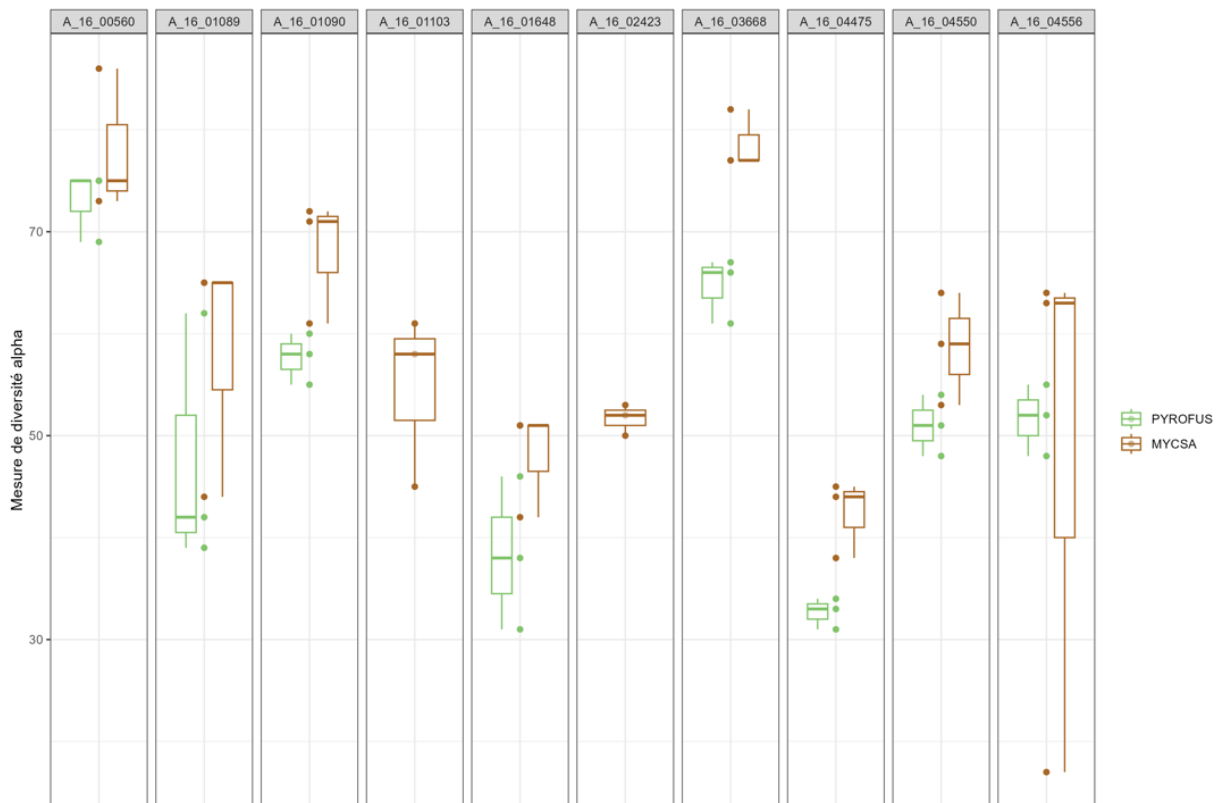


Figure 5 : Nombre d'ASV identifiés au sein des répliques. La mesure de la richesse observée (axe des ordonnées) est représentée pour chaque échantillon (en colonne) extrait dans le cadre du projet PYROFUS (en vert) ou dans le cadre de la thèse (MYCSA, en marron). Trois répliques ont été réalisés pour tous les échantillons, à chaque condition. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les répliques ($p\text{-value} > 0.05$).

Aucune différence significative ($p\text{-value} > 0.05$) n'a été observée entre les trois répliques d'un même échantillon. De même, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative ($p\text{-value} > 0.05$) entre les répliques extraits dans le cadre du projet PYROFUS ou dans le cadre de la thèse.

Nous avons ainsi validé la reproductibilité de la méthode au sein d'un même run de séquençage et également entre les différents laboratoires.

2.3. Mise au point des assignations au rang de l'espèce de *Fusarium*

Des témoins positifs, aussi appelés Mock ADN, ont été introduits sur chaque plaque de séquençage. L'élaboration des Mock consiste à mélanger l'ADN d'espèces connues afin de vérifier, après séquençage et traitement bio-informatique des données, que les espèces attendues sont bien identifiées. L'étude des Mock est ainsi vivement recommandée dans les analyses de métagénomique ciblée afin d'adapter les étapes de filtration et d'assignation des séquences (Karlsson et al., 2016; Walder et al., 2017).

Le Mock généré pour cette étude était composé de 11 espèces de *Fusarium* (Tableau 1, page 46). Dans un premier temps, nous avons vérifié l'assignation des séquences, obtenues après séquençage Sanger, par BLASTn sur la base de données « Fungi (taxid :4751) » du National Center for Biotechnology Information (NCBI). La souche I85, associée à *F. subglutinans* dans la collection fongique INRAE n'a pas été assignée à l'espèce attendue mais à *F. temperatum*. De même la souche I79, répertoriée comme *F. proliferatum* a été assignée à *F. fujikuroi*. Nous nous attendons donc, pour la suite des analyses des Mock à identifier 10 espèces fusariennes différentes.

Dans les quatre runs de séquençage, 6 575 785 séquences ont été générées à partir des Mock. Après les différentes étapes de filtration, 558 557 ont été conservées pour les analyses, permettant l'identification de 318 ASV. Parmi ces ASV, 259 ont été assignés soit *i*) à d'autres genres fongiques (30 % d'*Alternaria*, 17 % de *Cladosporium*, 0.8 % d'*Epicoccum* et de *Zymoseptoria*) soit *ii*) n'ont pas été assignés plus précisément qu'au rang du royaume fongique (50 % restants). Ces assignations non attendues dans les Mock témoignent de certaines limites rencontrées par le pipeline de traitement des données. Cependant, cela ne représentait que 13 % du nombre total de séquences identifiées dans les Mock. Ainsi, les 59 ASV assignés au genre *Fusarium* représentaient 87 % des séquences étudiées dans les Mock. Pour la suite des analyses des Mock nous nous sommes intéressés aux 11 ASV les plus abondants, représentant 97 % des séquences (Annexe 4), afin de mettre en évidence les 10 espèces de *Fusarium* attendues dans les Mock.

L'abondance relative de ces 11 ASV est représentée sur la Figure 6. Nous pouvons d'abord mettre en évidence la reproductibilité des proportions en espèces entre les différents Mock, à l'exception de quelques échantillons (Mock_7, Mock_8, Mock_10, Mock_11, Mock_18 et Mock_22). Pour ces derniers, nous pouvons soulever l'hypothèse d'un problème technique survenu à n'importe quelle étape de la méthode (de la préparation des bibliothèques jusqu'au traitement des données). Sur les 10 espèces de *Fusarium* initialement attendues dans le Mock (Tableau 1), 9 ont été identifiées (Figure 6), *F. graminearum* n'ayant pas été identifié. Boutigny et al. (2019) avaient également été confrontés à des problèmes d'assignation, sur des OTU, dans l'étude de certains de leur Mock avec quatre espèces retrouvées sur les 10 attendues. Pour comprendre ce problème d'assignation, les séquences des 11 ASV les plus abondants ainsi que des ASV non assignés jusqu'à l'espèce (en gris sur la Figure 6) ont été comparées par Blast (BLASTn, NCBI, Fungi taxid 4751).

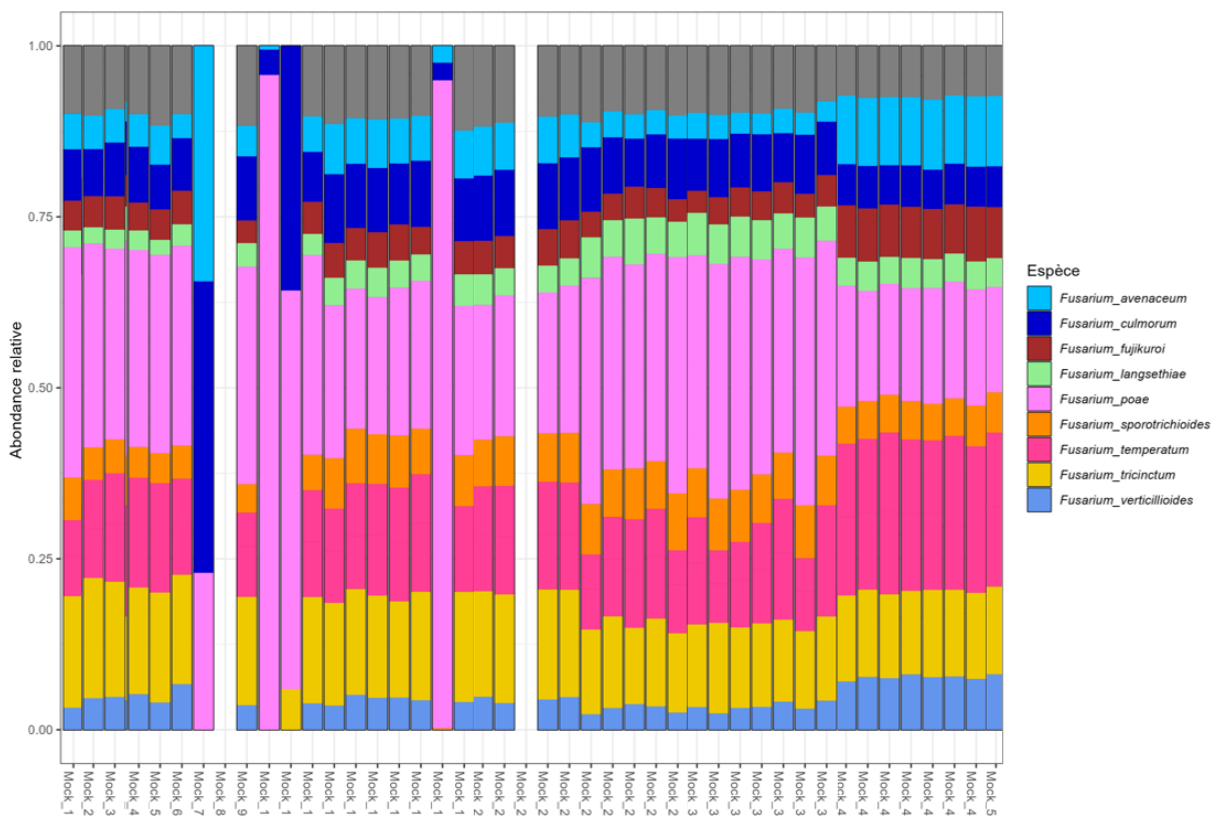


Figure 6 : Abondance relative des principaux ASV identifiés dans les Mock. La proportion de chaque espèce fusarienne (axe des ordonnées) est exprimée par rapport à la proportion totale du genre *Fusarium* dans chaque Mock (axe des abscisses). Les assignations des ASV sont renseignées au rang de l'espèce. Les barres grises représentent les assignations du genre *Fusarium* qui n'ont pas pu être menée jusqu'à l'espèce mais qui ont été confirmées comme *F. graminearum* par BLASTn).

Nous avons ainsi confirmé par BLASTn l'assignation jusqu'à l'espèce de *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. fujikuroi*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. temperatum*, *F. tricinctum* et *F. verticillioides*, attendues dans les Mock.

Enfin, nous avons également mis en évidence que les ASV non assignés jusqu'à l'espèce (en gris sur la Figure 6) correspondaient bien à *F. graminearum*. Ce problème d'assignation pour *F. graminearum* a déjà été soulevé dans d'autres études (Boutigny et al., 2019; Cobo-Díaz et al., 2019b) et s'explique par la similarité importante (> 98 %) des séquences de certaines espèces sur le gène EF1 α . Nous pensions nous affranchir de cette limite d'assignation en analysant les ASV, ce qui aurait dû nous permettre de différencier les espèces à une paire de base près (Al-Hatmi et al., 2016; Karlsson et al., 2016). Cependant, nous avons constaté que notre méthode d'assignation redescendait au niveau du genre fongique si elle était confrontée à une séquence ne se différenciant que d'une paire de base entre deux séquences de référence de la même espèce dans la base de données. *F. graminearum* étant l'espèce la plus documentée dans la littérature, notre base de données initiale comportait un grand nombre de séquences pouvant être assignées à cette même espèce. Ces problèmes rencontrés soulèvent l'importance de disposer de bases de données complètes et mises à jour régulièrement afin que les assignations soient les plus fines possibles. Aussi, pour la suite des analyses, nous avons utilisé notre propre base de données créée à partir de celles présentées dans Boutigny et al. (2019) et Cobo-Díaz et al. (2019b) (Annexe 3).

L'étude des Mock nous a ainsi permis de paramétrer notre pipeline de traitement des données afin de présenter des résultats solides dans la suite de ce manuscrit.

Résultats et discussion

1. Qualité du jeu de données de métabarcoding

Au total, 1 273 échantillons environnementaux ont été étudiés dans le cadre de ces travaux (Annexe 1). Les grains de blé tendre et blé dur ont été récoltés entre 2007 et 2022, partout en France. La majorité des échantillons (1 192) a été extraite à partir de farine de blé dans le cadre de cette thèse et 81 échantillons d'ADN déjà extraits ont été envoyés par Arvalis. La comparaison de ces échantillons a été validée par l'étude de contrôles, tel que décrit précédemment (voir partie « Reproductibilité de la méthode entre différents laboratoires », pages 55-56).

Les résultats obtenus sur les quatre runs de séquençage ont été fusionnés afin que tous les échantillons soient traités simultanément. La description de l'évolution du jeu de données, de la sortie de séquençage jusqu'à l'obtention des ASV est indiquée dans le Tableau 3. Au total, 41 700 521 séquences (16 % du jeu de données, couvrant en moyenne 32 758 séquences par échantillon) ont été conservées après les étapes de filtration. Les séquences du gène EF1 α assignées au genre *Fusarium* représentaient 20 % du jeu de données (couvrant en moyenne 6 701 séquences par échantillon), les 80 % restants (couvrant en moyenne 26 056 séquences par échantillon) ayant été identifiés comme d'autres genres fongiques dont *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diaporthe* ou *Zygomoseptoria*. Ces résultats sont cohérents avec les 5 à 95 % de séquences assignées à un autre genre que *Fusarium*, comme décrit dans Boutigny et al. (2019). Ces résultats reflètent les limites de la méthode, concernant les contaminations lors de la préparation des bibliothèques (Salter et al., 2014; Olomu et al., 2020) ou encore la spécificité du couple d'amorces ciblant le gène EF1 α . Cobo-Díaz et al. (2019b) ont développé un couple d'amorces ciblant une région plus restreinte du gène EF1 α (Figure 2, page 44). Ces amorces permettent l'amplification d'un fragment plus petit du gène et donc l'étude des séquences forward et reverse après chevauchement des lectures, contrairement aux amorces décrites dans Boutigny et al. (2019). Cependant, dans notre étude, nous avons tout de même étudié la diversité des *Fusarium* au rang de l'espèce, en conservant uniquement les séquences assignées au genre *Fusarium*. Nous avons ainsi fait le choix, de par notre couple d'amorce et notre large base de données, d'avoir accès à la diversité fongique dans les échantillons à l'échelle du

genre, ceci n'ayant pas été un frein pour la discrimination des *Fusarium* au rang de l'espèce.

Tableau 3 : Evolution du jeu de données au cours des étapes de filtration. Les nombres de séquence et d'ASV identifiés dans les échantillons sont indiqués en ligne. Output_Seq correspond aux données brutes de sortie de séquençage. Output_QIIME correspond aux données après filtration dans QIIME2. Input_Contrôles correspond aux données traitées pour la mise au point de la méthode (partie précédente). Input_Ech correspond aux données traitées pour l'analyse des échantillons environnementaux (récoltés sur blés). Output_Ech correspond aux données obtenues après filtration des ASV et qui seront traitées dans la suite des analyses. Output_*Fusarium* et Output_Autre indiquent respectivement la représentativité de *Fusarium* et des autres genres fongiques dans le jeu de données étudié.

	Output_Seq	Output_QIIME	Input_Contrôles	Input_Ech	Output_Ech	Output_ <i>Fusarium</i>	Output_Autre
Nb_Ech	1 389	1 389	130	1 273	1 273	1 273	1 273
Nb_Seq	266 083 297	49 296 586	1 747 517	44 733 973	41 700 521	8 530 657	33 169 864
Nb_ASV		16 940	1 117	16 502	2 550	291	2 259

2. Analyse de la diversité des espèces de *Fusarium* et des profils de mycotoxines associées

2.1. Espèces fusariennes majoritaires et corrélations

Au total, 291 ASV ont été assignés au genre *Fusarium* dans les 1 273 échantillons. La Figure 7 montre le nombre de séquences assignées aux 35 ASV les plus abondants. Nous avons observé que les deux premiers ASV représentaient la majeure partie du jeu de données avec respectivement 56 et 22 % du nombre de séquences total assignées au genre *Fusarium*. Les 8 ASV suivants représentaient au total 21 % du jeu de données, les ASV restant ne représentaient qu'une part négligeable du jeu de données.

Ainsi, les 10 ASV les plus abondants représentaient à eux seuls 95 % du jeu de données global des *Fusarium*. L'étude de ces 10 ASV aurait été envisageable mais afin de ne pas omettre l'étude d'espèces rares, nous avons fait le choix, pour la suite des analyses, de s'intéresser aux 30 ASV les plus abondants (98 % du jeu de données). Ceux-ci correspondaient à 14 espèces fusariennes, présentées dans le Tableau 4 et qui seront étudiées dans la suite de ce manuscrit.

En moyenne, cinq espèces fusariennes différentes ont été identifiées dans chaque échantillon, le maximum observé dans un même échantillon ayant été de 11 espèces différentes.

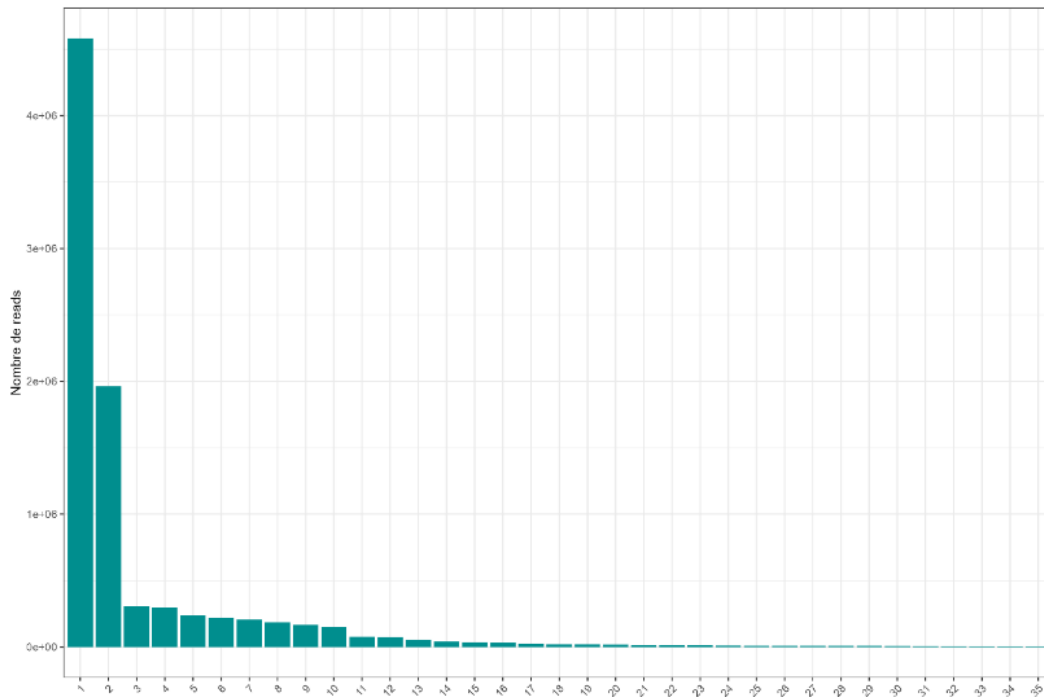


Figure 7 : Nombre de séquences total assignées aux 35 ASV les plus abondants, assignés au rang de l'espèce de *Fusarium* dans les échantillons environnementaux. Le nombre de séquences (axe des ordonnées) a été calculé par la somme du nombre de séquences pour chaque ASV (axe des abscisses) au sein de chaque échantillon. Par soucis de lisibilité, seuls les 35 ASV les plus abondants sont représentés.

F. graminearum et *F. poae* ont été identifiées comme les espèces prédominantes, représentant respectivement 56 et 22 % du jeu de données et étant détectées dans 97 % des échantillons (Tableau 4). *F. langsethiae*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum* et *F. culmorum* ont également été identifiées comme des espèces majoritaires, représentant respectivement 6, 5, 5 et 3 % du jeu de données. Ces espèces étaient cependant moins fréquentes, étant observées dans 68, 67, 70 et 44 % des échantillons, respectivement (Tableau 4). Enfin, nous avons mis en évidence la présence d'espèces minoritaires, identifiées moins fréquemment dans les échantillons (entre 3 et 26 %) : *F. sporotrichioides* (0.4 % du jeu de données), *F. cerealis* (0.2 %), *F. acuminatum* (0.2 %), *F. proliferatum* (0.2 %), *F. oxysporum* (0.2 %), *F. juglandicola* (0.1 %), *F. clavum* (0.08 %) et *F. sambucinum* (0.04 %). Les espèces que nous avons identifiées sont les plus communément associées à la FHB en Europe, *F. langsethiae* ayant émergé plus récemment (loos et al., 2004; Xu, 2016; Karlsson et al., 2016, 2021). À nos connaissances, *F. juglandicola* et *F. clavum* n'ont été observés sur blé que très rarement (Leyva-Mir et al., 2022; Nguyen et al., 2024). La présence de *F. proliferatum*, communément associée aux maïs, est plus surprenante même si cette

espèce a déjà été mise en évidence dans des blés cultivés en Argentine (Cendoya et al., 2018).

Tableau 4 : Récapitulatif des espèces fusariennes majoritaires identifiées dans les échantillons environnementaux. La représentativité par rapport au jeu de données total assigné au genre *Fusarium* a été calculée pour chaque espèce en fonction du nombre de séquences observées sur les 30 ASV majoritaires sélectionnés. La fréquence de détection des différentes espèces dans les échantillons est également indiquée.

Espèce	Représentativité	Fréquence d'échantillons contaminés
<i>F. graminearum</i>	56 %	97 %
<i>F. poae</i>	22 %	97 %
<i>F. langsethiae</i>	6 %	68 %
<i>F. tricinctum</i>	5 %	67 %
<i>F. avenaceum</i>	5 %	70 %
<i>F. culmorum</i>	3 %	44 %
<i>F. sporotrichioides</i>	0,4 %	26 %
<i>F. cerealis</i>	0,2 %	5 %
<i>F. acuminatum</i>	0,2 %	11 %
<i>F. proliferatum</i>	0,2 %	14 %
<i>F. oxysporum</i>	0,2 %	12 %
<i>F. juglandicola</i>	0,1 %	10 %
<i>F. clavum</i>	0,08 %	6 %
<i>F. sambucinum</i>	0,04 %	3 %

Les corrélations entre les espèces fusariennes identifiées dans les échantillons environnementaux sont présentées dans la Figure 8. Des corrélations moyennes à faibles ($0.1 < r < 0.5$) mais significatives ($p\text{-value} < 0.05$) entre les 14 espèces ont été observées dans 57 % des cas. *F. tricinctum* a été l'espèce la plus souvent impliquée dans des corrélations (77% des cas), contrairement à *F. cerealis*, uniquement corrélée à *F. juglandicola* (Figure 8). De façon générale, la présence de *F. graminearum* a été anti-corrélée avec les autres espèces. Plus précisément, une corrélation négative, moyennement forte, a été observée entre *F. graminearum* et *F. poae* ($r = -0.48$, $p\text{-value} = 5,2 \cdot 10^{-73}$). De même avec *F. langsethiae* ($r = -0.20$, $p\text{-value} = 3,0 \cdot 10^{-13}$) et *F. tricinctum* ($r = -0.17$, $p\text{-value} = 4,4 \cdot 10^{-10}$) où de faibles corrélations négatives ont été observées. De la même façon, *F. avenaceum* a été corrélé faiblement et négativement à *F. poae* ($r = -0.12$, $p\text{-value} = 9,6 \cdot 10^{-6}$). Toutes les autres corrélations significatives se sont montrées positives, même si plus ou moins fortes, la corrélation la plus importante

ayant été observée entre *F. tricinctum* et *F. langsethiae* ($r = 0.33$, $p\text{-value} = 6,8.10^{-33}$; Figure 8).

Ces résultats appuient certaines observations et hypothèses de la littérature concernant les associations d'espèces fusariennes sur blé et les changements dans la composition des populations (Waalwijk et al., 2003; Audenaert et al., 2009; Valverde-Bogantes et al., 2020; Karlsson et al., 2021). En effet, des études antérieures ont décrits des interactions significatives entre *F. poae*, *F. graminearum* et *F. avenaceum* deux à deux, dans des blés récoltés en Europe sur différentes années et à différents stades phénologiques (Xu et al., 2005; Audenaert et al., 2009). Les corrélations impliquant d'autres espèces que les trois précédentes suggérées par nos travaux n'ont, à notre connaissance, que très rarement été signalées. Ces corrélations ont été obtenues sur l'ensemble des échantillons sans tenir compte de leur localisation géographique, année ou itinéraire technique. Elles peuvent donc être expliquées par une multitude de facteurs. Un de ces facteurs pourrait être des caractéristiques écophysiological différentes. La corrélation négative entre *F. graminearum* et *F. poae* pourrait, entre autres, résulter de préférences différentes en termes de température de croissance. Cette hypothèse est aussi soulevée par les auteurs de plusieurs études menées en Italie (Xu et al., 2008; Pancaldi et al., 2010; Covarelli et al., 2015), qui ont décrit le remplacement de *F. graminearum* par *F. poae* au cours de saisons particulièrement chaudes.

Enfin, nos résultats corroborent la prédominance de *F. graminearum* qui, selon certains auteurs, résulte de son avantage compétitif dans la colonisation des épis de blés, en partie dû à la production de DON (Audenaert et al., 2013; Roucou, 2023; Beccari et al., 2024).

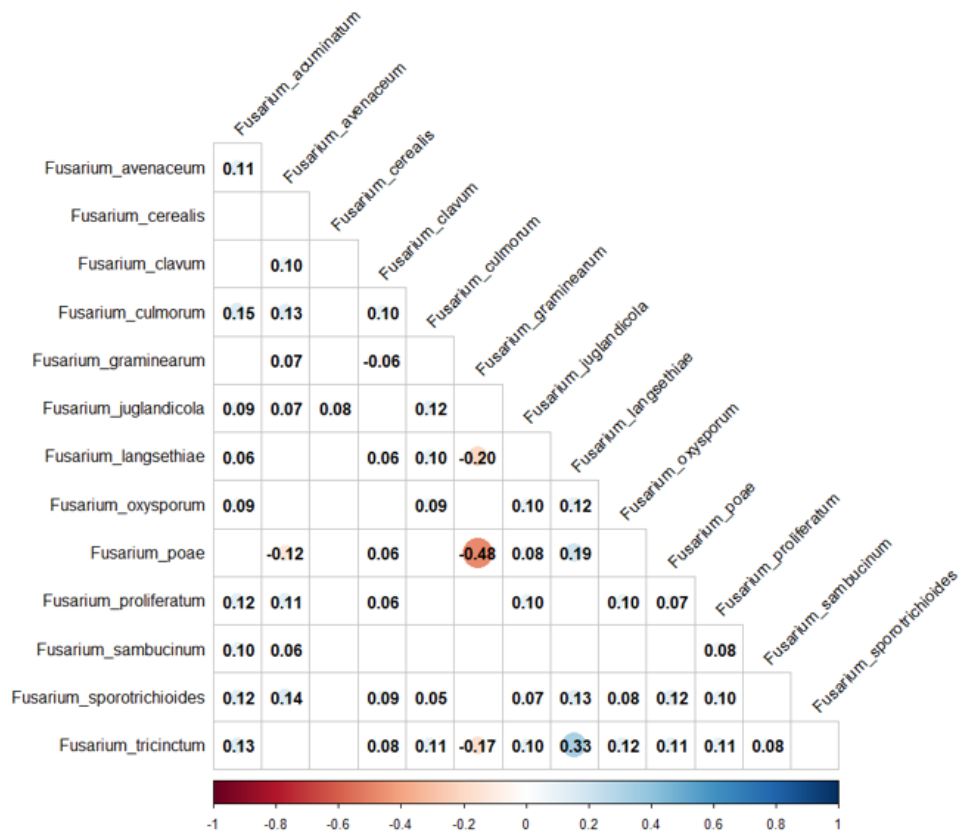


Figure 8 : Matrice des corrélations entre les espèces fusariennes majoritaires identifiées dans les échantillons environnementaux. La corrélation a été déterminée entre la proportion de chaque espèce, après transformation clr. Le coefficient de corrélation de Pearson est indiqué uniquement si la *p-value* est significative (<0.05). Plus la corrélation est forte, plus la taille du cercle est importante. Les corrélations positives tendent vers le bleu et les corrélations négatives vers le rouge.

2.2. Mycotoxines majoritaires et corrélations

Toutes les mycotoxines recherchées (ENNA, ENNA1, ENNB1, ENNB1, ADON, DON, T-2, HT-2, FX, BEA, NIV et ZEA) ont été détectées dans au moins un échantillon environnemental, à l'exception de la DAS qui ne sera donc pas traitée dans la suite des analyses. Au total, 1 119 échantillons (88 %) ont été contaminés par au moins une de ces mycotoxines. Pour la suite des analyses, les mycotoxines seront regroupées par classe : ENN (somme de ENNA, ENNA1, ENNB et ENNB1 ; avec ENNB1 majoritaire : 74 % des échantillons pour une concentration moyenne de 97 ng.g⁻¹), DON + ADON (58 % des échantillons pour une concentration moyenne de 436 ng.g⁻¹) et TCTA (T-2 + HT-2 ; détectées au seuil minimal de quantification de 25 ng.g⁻¹ dans les mêmes échantillons).

La fréquence de détection des mycotoxines dans les échantillons est indiquée sur la Figure 9. Les mycotoxines les plus fréquemment observées dans les échantillons

environnementaux étaient les ENN et le DON + ADON, détectés respectivement dans 80 et 59% des échantillons. Les autres mycotoxines ont été moins souvent détectées, dans 10, 7, 5 et 5 % des échantillons pour la BEA, le NIV, la ZEA et les TCTA, respectivement ; la FX ayant été détectée en très faible quantité (25 ng.g⁻¹, soit le seuil de quantification minimal) dans uniquement quatre échantillons (0.3 % ; Figure 9). Le DON + ADON était majoritaire dans les échantillons environnementaux, avec une concentration moyenne de 440 ng.g⁻¹, suivis par le NIV (189 ng.g⁻¹) et les ENN (166 ng.g⁻¹), les autres mycotoxines ayant été quantifiées en très faible quantité (Figure 9). D'après les réglementations européennes concernant les quantités limites de mycotoxines autorisées dans les denrées alimentaires (Alshannaq & Yu, 2017), nous avons mis en évidence qu'aucun de nos échantillons environnementaux ne dépassaient les seuils maximaux concernant la ZEA (100 ng.g⁻¹), de même pour les TCTA, à l'exception d'un unique échantillon (104 ng.g⁻¹ pour la limite maximale fixée à 100 ng.g⁻¹). Concernant le DON + ADON, 59 échantillons (8 %) dépassaient le seuil réglementaire de 1 000 ou 1 500 ng.g⁻¹, sur blé tendre et blé dur respectivement. En effet, les concentrations quantifiées allaient de 1509 à 9375 ng.g⁻¹.

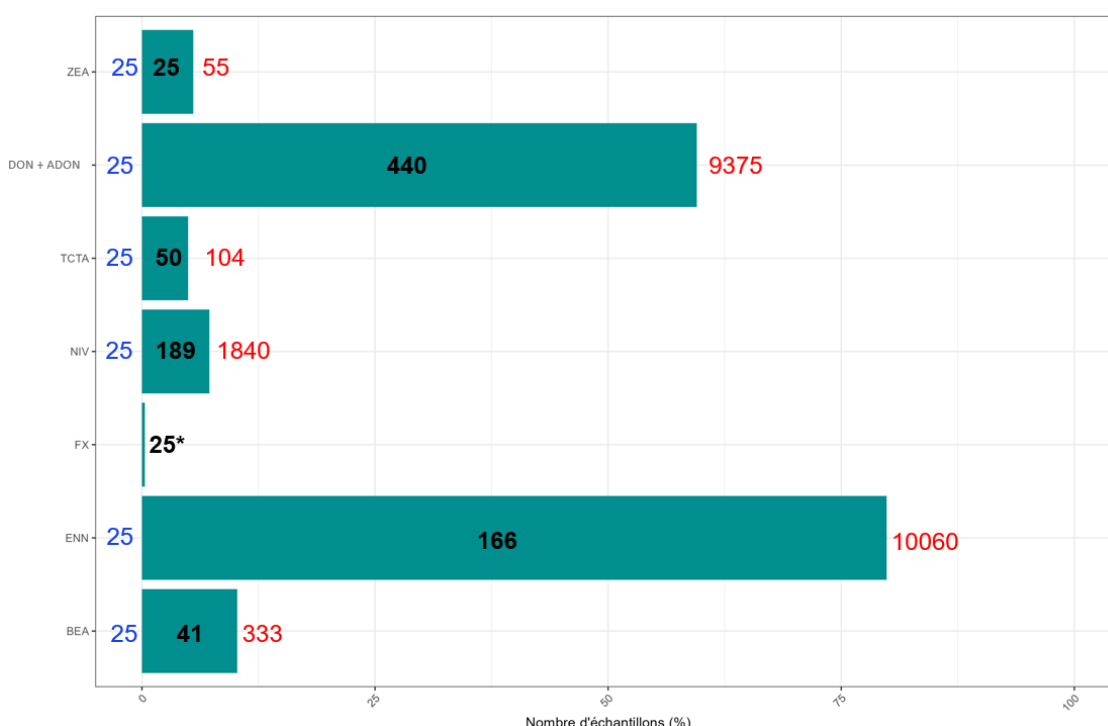


Figure 9 : Fréquence de détection des mycotoxines dans les échantillons environnementaux. Le nombre d'échantillon (axe des abscisses) dans lequel chaque mycotoxine (axe des ordonnées) a été détectée est exprimé en pourcentage. La concentration moyenne (en noir et en gras) de chaque mycotoxine a été calculée dans les échantillons où la mycotoxine a été détectée. Les concentrations minimales (en bleu, 25 ng.g⁻¹ correspondant au seuil minimal de quantification) et maximales (en rouge) observées dans les échantillons sont indiquées pour chaque mycotoxines. La FX a été détectée dans uniquement 4 échantillons et au seuil minimal de quantification (indiqué par *).

Les corrélations entre les mycotoxines sont représentées sur la Figure 10, à l'exception de la FX, identifiée dans seulement 4 échantillons. Des corrélations positives ($r > 0$) et significatives ($p\text{-value} < 0.05$) ont été observées dans 53 % des cas. De fortes corrélations ont été observées entre les TCTA et la ZEA ($r = 0.91$, $p\text{-value} = 0$) ainsi qu'entre le DON + ADON et le NIV ($r = 0.57$, $p\text{-value} = 2,4.10^{-108}$). La forte corrélation observée entre ZEA et TCTA et non pas entre ZEA et DON + ADON interroge. En effet, la ZEA et le DON + ADON sont produits par les mêmes espèces. Il faut cependant nuancer ce résultat car seulement 5 % de nos échantillons ont été caractérisés par des niveaux quantifiables de TCTA ou de ZEA. Les autres corrélations significatives observées se sont montrées très faibles (r entre 0.06 et 0.13 ; Figure 10). Nos résultats mettent en évidence la co-occurrence de certaines mycotoxines dans nos échantillons environnementaux, comme cela a également été montré en Europe (Bottalico & Perrone, 2002; Smith et al., 2016). Smith et al. (2016) ont fait une synthèse des études s'intéressant à la co-occurrence naturelle des mycotoxines dans les produits alimentaires, mettant en évidence une tendance à la co-contamination par le DON + ADON et la ZEA.

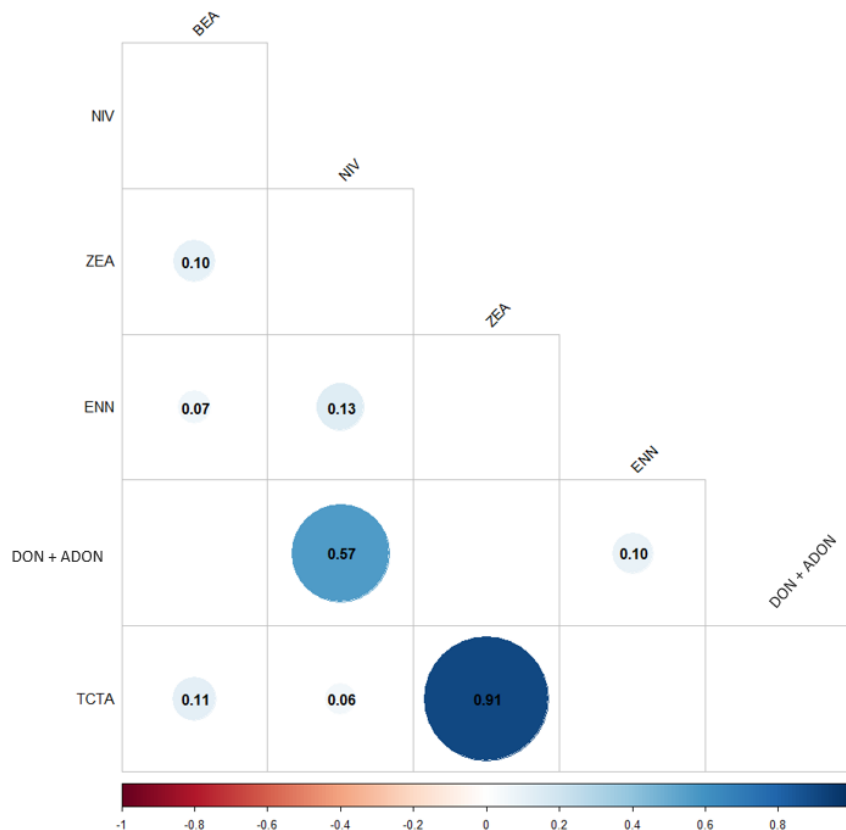


Figure 10 : Matrice des corrélations entre les mycotoxines identifiées dans les échantillons environnementaux. La corrélation a été déterminée entre les concentrations de chaque mycotoxine. Le coefficient de corrélation de Pearson est indiqué uniquement si la $p\text{-value}$ est significative (< 0.05). Plus la corrélation est forte, plus la taille du cercle est importante. Les corrélations positives tendent vers le bleu et les corrélations négatives vers le rouge.

Cependant, l'étude de Smith et al. (2016) concerne les produits céréaliers en général et pas seulement le blé ; elle intègre aussi le maïs, connu pour être une des céréales les plus contaminées par la ZEA, ce qui pourrait expliquer la forte association reportée. De plus, les corrélations que nous avons observées soulèvent l'hypothèse d'associations d'espèces productrices de différents types de mycotoxines.

3. Occurrence des espèces fusariennes prédominantes en fonction des mycotoxines quantifiées

Après avoir traité indépendamment les données d'occurrence des espèces et de quantité des mycotoxines, nous avons cherché à mettre en évidence des tendances concernant la distribution des espèces fusariennes en fonction des mycotoxines quantifiées dans les échantillons environnementaux (Figure 11). Nous nous attendions à mettre en évidence un lien entre les espèces fusariennes et leurs mycotoxines associées, par exemple avec une proportion majoritaire de *F. avenaceum* en présence d'ENN ou de *F. langsethiae* en présence de TCTA. Cependant, nous n'avons pas observé de tendance particulière, les mêmes distributions d'espèces ayant été observées pour l'ensemble des mycotoxines. En effet, quelle que soit la mycotoxine quantifiée dans l'échantillon, la distribution des espèces globale était la même avec *F. graminearum* et *F. poae* significativement prédominants (p -values < 0.05) par rapport à *F. langsethiae*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* et *F. tricinctum* (Figure 11). Ces résultats confirment la forte corrélation précédemment observée entre le DON + ADON et le NIV, ces mycotoxines étant majoritairement produites au champ par *F. graminearum* et *F. poae*. De plus, ces deux espèces ont été décrites comme productrices d'un large panel de mycotoxines, ce qui pourrait expliquer leur association avec la majorité des mycotoxines. En effet, Bottalico and Perrone (2002) ont synthétisé les résultats de diverses études basées sur la détection de mycotoxines dans des échantillons, notamment de blé et ont conclu que, globalement, *F. graminearum* pouvait être associé à la production de DON, ZEA et NIV ; de même pour *F. poae* avec la BEA, les ENN et le NIV. Notons tout de même qu'à ce jour en France, la contamination du blé par le NIV est plus fréquemment associée à *F. poae* qu'à *F. graminearum* (Boutigny et al., 2014). Nos données, qui ont suggéré une corrélation négative entre *F.*

graminearum et *F. poae* et positive entre DON + ADON et NIV, ne vont cependant pas dans ce sens.

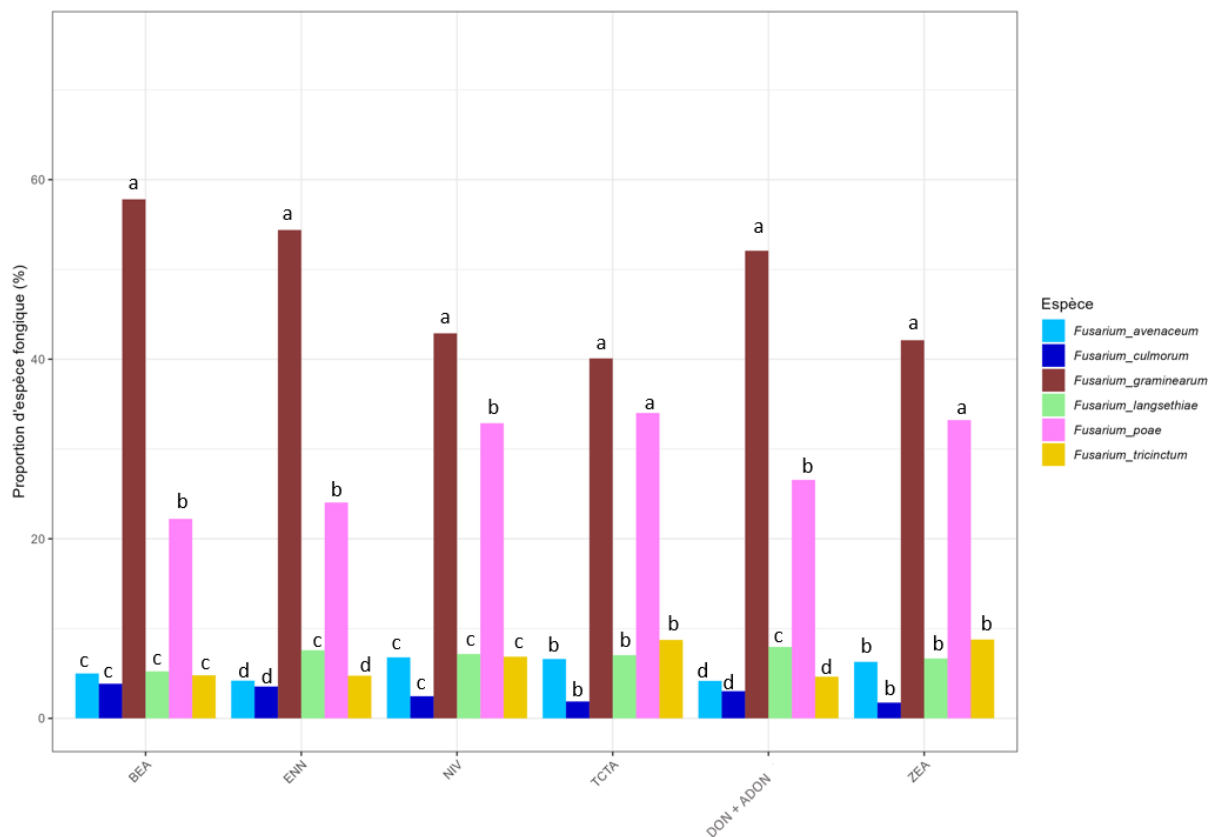


Figure 11 : Distribution des espèces fusariennes en fonction des mycotoxines. La proportion moyenne des six espèces fusariennes majoritaires (axe des ordonnées) a été calculée pour chaque mycotoxine lorsqu'elle était quantifiée dans l'échantillon. Les lettres indiquent les différences significatives entre les proportions moyennes des espèces, pour chaque mycotoxine respectivement (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

Pour la suite du manuscrit, nous mettrons en évidence les différences de distribution de ces espèces majoritaires et des profils de mycotoxines associées en fonction des années et de différents facteurs environnementaux et climatiques.

4. Distribution temporelle des espèces fusariennes et des profils de mycotoxines associées

4.1. Distribution temporelle des espèces fusariennes

Le Tableau 5 récapitule le nombre d'échantillons de blé tendre et de blé dur dans lequel chaque espèce fusarienne a été identifiée, pour chaque année de récolte, à l'exception de 2015 où seulement 13 échantillons étaient disponibles. De façon générale, les mêmes espèces majoritaires ont été identifiées sur les 15 dernières années, dans les échantillons de blé tendre et de blé dur, *F. graminearum* et *F. poae*

étant les espèces les plus fréquentes, suivies par *F. langsethiae*, *F. tricinctum* et *F. avenaceum* (Tableau 5). Cependant, des différences ont été observées en fonction des années et de l'hôte (blé tendre ou blé dur). Par exemple, pour 9 années sur 10, *F. graminearum* a été identifié plus fréquemment dans les échantillons de blé tendre que de blé dur. *F. langsethiae* était plus fréquent sur les dernières années de récolte (2021 et 2022) contrairement à *F. avenaceum* présent sur plus d'échantillons entre 2007 et 2016.

Tableau 5 : Fréquence des espèces fusariennes majoritaires identifiées dans les échantillons de blé tendre et de blé dur sur les 15 dernières années. Le nombre d'échantillon de blé tendre et de blé dur contaminés par chaque espèce respectivement est indiqué en pourcentage, pour chaque année de récolte. Pour chaque année, les trois espèces les plus fréquemment observées sur blé tendre et blé dur ont été mises en évidence en orange, vert et bleu (de la plus fréquente à la moins fréquente). La préférence d'hôte (blé tendre ou blé dur) pour chaque espèce est indiquée en rouge.

Espèce	2007		2008		2009		2014		2016		2017		2018		2019		2020		2021		2022	
	BT	BD	BT	BD	BT	BT	BD	BT	BD	BT	BD	BT	BD	BT	BD	BT	BD	BT	BD	BT	BD	
<i>F. acuminatum</i>	13%	1%	15%	5%	2%	2%	7%	6%	3%	0%	2%	2%	10%	0%	1%	4%	5%	9%	7%	3%	6%	
<i>F. avenaceum</i>	76%	22%	63%	32%	66%	41%	39%	57%	29%	27%	4%	42%	32%	23%	21%	29%	25%	47%	34%	36%	26%	
<i>F. cerealis</i>	9%	1%	3%	2%	7%	5%	2%	6%	0%	2%	0%	1%	3%	0%	0%	3%	1%	3%	2%	3%	2%	
<i>F. clavum</i>	6%	1%	3%	0%	0%	0%	5%	3%	2%	0%	0%	3%	5%	0%	1%	3%	1%	4%	6%	7%	8%	
<i>F. culmorum</i>	44%	9%	25%	11%	27%	7%	20%	27%	19%	18%	4%	22%	15%	5%	6%	35%	19%	41%	33%	28%	28%	
<i>F. graminearum</i>	77%	23%	67%	33%	100%	50%	50%	57%	43%	84%	13%	65%	33%	63%	36%	51%	38%	56%	43%	49%	47%	
<i>F. juglandicola</i>	15%	2%	9%	4%	5%	9%	2%	13%	2%	4%	0%	4%	2%	1%	2%	6%	2%	13%	6%	2%	2%	
<i>F. langsethiae</i>	38%	20%	32%	27%	63%	32%	43%	17%	33%	45%	13%	29%	24%	33%	27%	32%	27%	48%	36%	47%	49%	
<i>F. oxysporum</i>	9%	4%	2%	4%	7%	2%	5%	0%	11%	0%	0%	3%	11%	3%	3%	2%	8%	13%	14%	7%	9%	
<i>F. poae</i>	77%	22%	65%	33%	100%	50%	50%	48%	43%	82%	14%	62%	33%	57%	35%	57%	37%	57%	43%	51%	49%	
<i>F. proliferatum</i>	10%	13%	6%	15%	2%	5%	9%	2%	6%	2%	4%	2%	15%	1%	6%	3%	5%	7%	12%	4%	7%	
<i>F. sambucinum</i>	6%	1%	5%	0%	2%	0%	0%	3%	0%	0%	0%	1%	3%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	1%	1%	
<i>F. sporotrichioides</i>	39%	7%	24%	11%	15%	2%	7%	16%	13%	9%	2%	13%	17%	5%	7%	6%	3%	17%	14%	17%	20%	
<i>F. tricinctum</i>	68%	22%	50%	32%	78%	39%	36%	32%	40%	32%	5%	24%	27%	18%	20%	32%	31%	38%	38%	31%	45%	

L'année et la plante hôte ont bien été identifiées comme des facteurs influençant de façon significative la distribution des espèces fusariennes dans les échantillons (PERMANOVA < 0.05), comme cela a déjà largement été mis en évidence dans des études s'intéressant à l'effet de facteurs climatiques ou de la sensibilité des variétés de blé à la fusariose (Pancaldi et al., 2010; Valverde-Bogantes et al., 2020; Dubois & Roucou, 2023; Roucou, 2023; Nguyen et al., 2024). Les différences de prédominance des espèces dans les échantillons en fonction des années, pour le blé tendre et le blé dur, sont représentées sur la Figure 12.

L'étude de la répartition des espèces fusariennes a confirmé la prédominance de *F. graminearum* et *F. poae* sur les 15 années d'échantillonnage, quelle que soit la plante hôte, avec une proportion moyenne de 53 et 25 %, respectivement (Figure 12). Cependant, certaines années semblent avoir été plus propices à la contamination par l'une ou l'autre de ces deux espèces. Par exemple, en 2022, *F. poae* était prédominant

sur blé tendre et blé dur avec une proportion de 0.54 et 0.48, respectivement, contre 0.20 et 0.17 de *F. graminearum*, respectivement (Figure 12). Le remplacement de *F. graminearum* par *F. poae* a largement été documenté, spécialement en Italie, sur différentes années (Xu et al., 2008; Pancaldi et al., 2010; Covarelli et al., 2015). Cette tendance n'est pas réellement évidente avec nos données. Nous avons également mis en évidence une plus forte contamination du blé dur par *F. langsethiae* en 2022, en comparaison avec les autres années, avec une proportion de 0.26 sur blé dur (Figure 12).

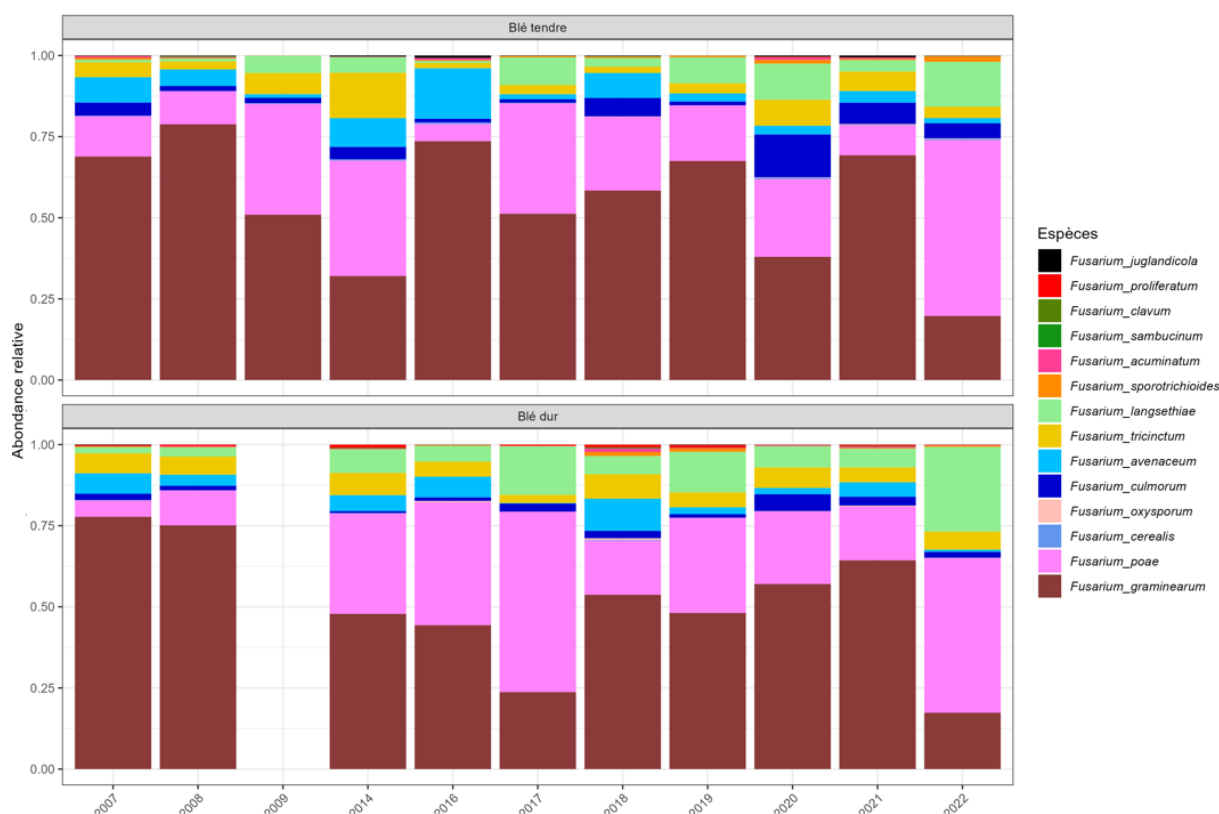


Figure 12 : Abondance relative des 14 espèces fusariennes majoritaires dans les échantillons environnementaux sur les 15 dernières années. L'abondance relative (axe des ordonnées) des espèces fusariennes dans les échantillons de blé tendre et de blé dur est exprimée en proportion de chaque espèce sur l'abondance totale du genre *Fusarium*, pour chaque année (axe des abscisses) d'échantillonnage.

Nos résultats sur les années 2014 et 2021-2022 se sont révélés cohérents avec d'autres études ayant également utilisé une approche de métabarcoding ciblant le gène EF1 α sur des échantillons de blé français. En effet, Boutigny et al. (2019) ont mis en évidence, en 2014 et 2015, une prédominance de *F. graminearum* et *F. poae* suivi par *F. langsethiae*, *F. culmorum* et *F. avenaceum*. Ces résultats sont en adéquation avec les observations générales de notre étude. Ces mêmes auteurs n'ont pas directement comparé leur résultat d'abondance de chaque espèce sur blé tendre et

blé dur. Cependant, leurs résultats suggèrent une présence de *F. culmorum* et *F. avenaceum* plus fréquente sur blé tendre que sur blé dur, comme nous l'avons mis en évidence en 2014, mais également de façon générale sur les 15 années d'échantillonnage avec une proportion moyenne de *F. culmorum* de 0.040 sur blé tendre contre 0.021 sur blé dur, de même pour *F. avenaceum* avec 0.053 et 0.04, respectivement (Figure 12).

De même, Nguyen et al. (2024) ont mis en évidence une prédominance de *F. graminearum* et *F. poae* sur différents sites échantillonnés en 2021 et 2022, ce qui est cohérent avec nos résultats. Ces mêmes auteurs ont également décrit *F. avenaceum* comme une espèce majoritaire en 2021, avec une abondance allant de 23 à 54 %. Dans notre étude, la présence de *F. avenaceum* en 2021 était moindre, avec une proportion de 4 %, comme *F. culmorum*, *F. langsethiae* ou *F. tricinctum*. Enfin, la prédominance de *F. poae* et la présence de *F. langsethiae*, sur 1/3 des sites échantillonnés en 2022 ont également été mises en évidence par Nguyen et al. (2024). Cependant, ces auteurs n'ont pas identifié *F. langsethiae* en 2021, contrairement à nos résultats. De façon générale, nos résultats concernant la diversité des espèces fusariennes sur les blés français sont en adéquation avec la littérature, suggérant une reproductibilité des différentes méthodes NGS de métagénomique ciblée, comme cela a déjà été montré entre différentes études (Makiola et al., 2019).

Nos résultats suggèrent tout de même une plus grande diversité, se justifiant en partie par le nombre important d'échantillons traités sur la période étudiée. En effet, Boutigny et al. (2019) et Nguyen et al. (2024) se sont intéressés à une soixantaine d'échantillons maximum, limitant l'observation de la diversité globale dans les champs. Enfin, Nguyen et al. (2024) ont ciblé une région restreinte du gène EF1 α en utilisant un couple d'amorces différent et une base de données plus restreinte (Cobo-Díaz et al., 2019b), pouvant également expliquer certaines différences dans nos résultats. Cependant, ces biais entre les différentes études ne semblent pas impacter les conclusions générales, nos résultats étant en adéquation.

4.2. Distribution temporelle des profils de mycotoxines

Pour l'analyse de la distribution temporelle des profils de mycotoxines dans les 1 273 échantillons, nous nous sommes particulièrement intéressés au DON + ADON (Figure

13) et aux ENN (Figure 14), leur présence au champ étant systématique, contrairement aux autres mycotoxines non quantifiées sur certaines années.

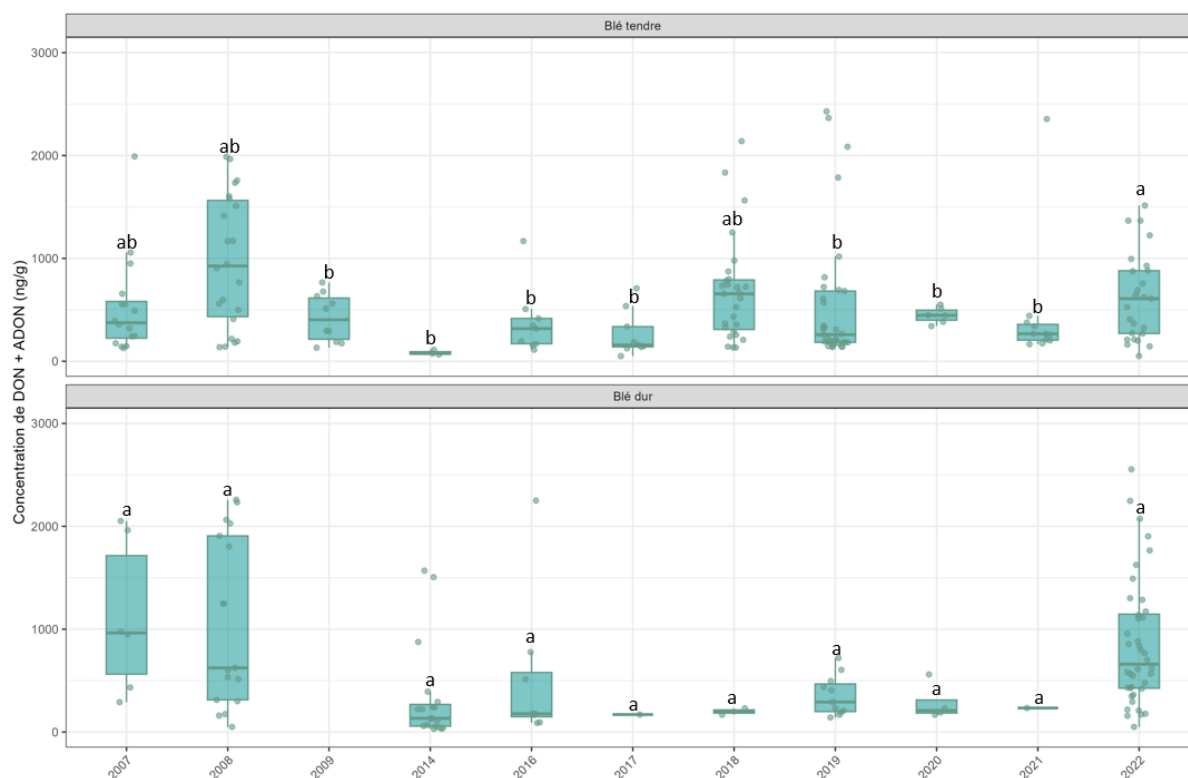


Figure 13 : Concentration de DON + ADON dans les échantillons de blé tendre et de blé dur sur les 15 dernières années. Les boîtes à moustache représentent les quantités de DON + ADON (axe des ordonnées) détectées dans les échantillons pour chaque année (axe des abscisses). Chaque point représente un échantillon. Les lettres indiquent les différences significatives entre les quantités de DON + ADON pour les échantillons de blé tendre et de blé dur, respectivement (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

De façon générale, nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif de l'année sur la distribution du DON + ADON ou des ENN ($p\text{-value} > 0.05$), quelle que soit la plante hôte. Nous avons tout de même observé une tendance plus favorable à la contamination du blé tendre par le DON + ADON et les ENN pour les années 2007, 2008, 2018 et 2022 (Figures 13 et 14, respectivement). Nous avons également observé une tendance plus favorable à la contamination des échantillons de blé dur par les ENN pour les années 2007, 2008, 2014, 2016 et 2022 (Figure 14).

Nous avons ainsi mis en évidence différents effets des facteurs sur la distribution des espèces et des mycotoxines associées. En effet, l'année semble impacter différemment la distribution des mycotoxines et celle des espèces fusariennes majoritaires, suggérant l'implication d'autres facteurs, tel que le climat, dans les différences de distribution des mycotoxines (Smith et al., 2016).

Pour la suite de ce manuscrit, nous chercherons à mettre en évidence l'effet de facteurs climatiques sur les mycotoxines, l'effet du climat sur la distribution des espèces fusariennes ayant été déjà largement démontré dans la littérature (Van Der Lee et al., 2015; Banik et al., 2018; Nogueira et al., 2018; Valverde-Bogantes et al., 2020; Karlsson et al., 2021).

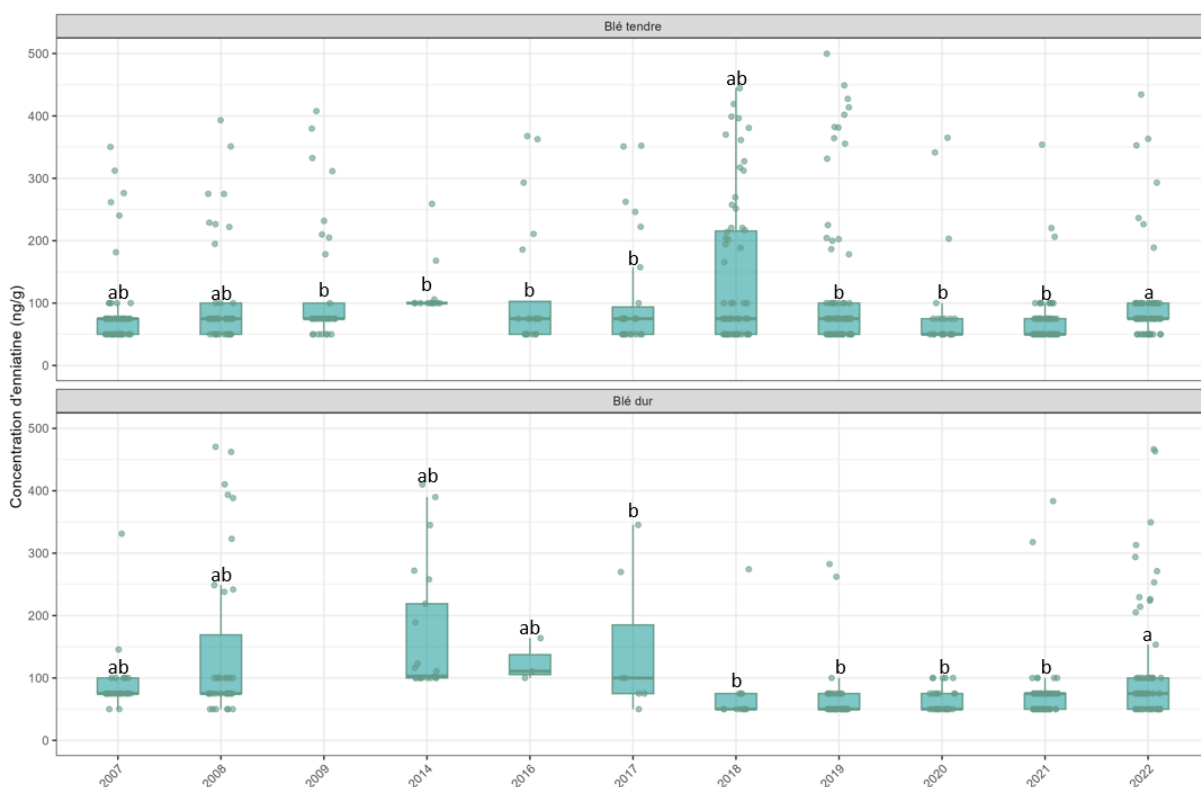


Figure 14 : Concentration d'enniatines dans les échantillons de blé tendre et de blé dur sur les 15 dernières années. Les boîtes à moustache représentent les quantités d'ENN (axe des ordonnées) détectées dans les échantillons pour chaque année (axe des abscisses). Chaque point représente un échantillon. Les lettres indiquent les différences significatives entre les quantités d'ENN pour les échantillons de blé tendre et de blé dur, respectivement (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

5. Analyse de l'effet de facteurs climatiques sur la distribution des profils de mycotoxines

5.1. Présentation des données climatiques

Les Figures 15 et 16 représentent les données de température et de pluviométrie mesurées au champ durant les sept jours autour de la floraison, sur les 15 dernières années. L'effet de l'année sur ces deux facteurs était significatif ($p\text{-value} < 0.05$).

L'année 2022 a significativement été la plus chaude ($p\text{-value} < 0.05$) sur les 7 jours autour de la floraison, avec une moyenne des températures cumulées de 252°C ; suivie par les années 2017 et 2009 avec des moyennes respectives de 242 et 239°C (Figure 15). L'année 2014 a été identifiée comme la moins chaude avec 200°C (Figure 15).

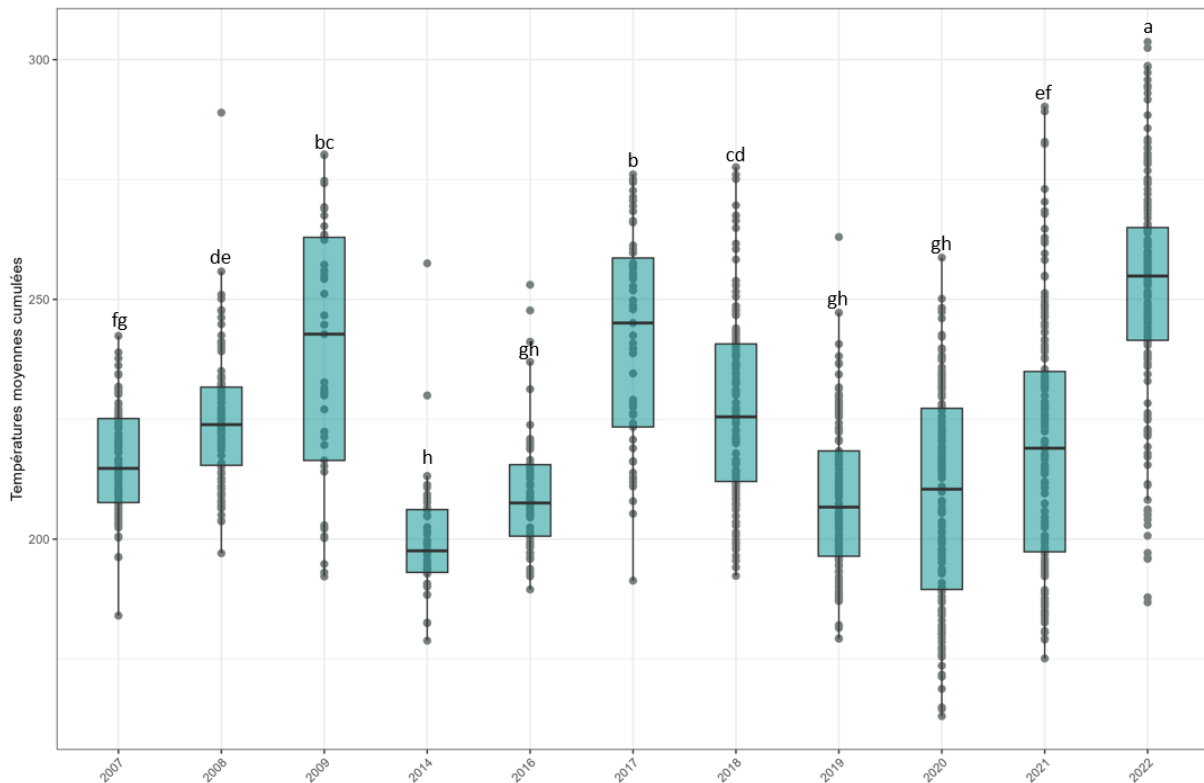


Figure 15 : Récapitulatif des températures sur les parcelles échantillonnées sur les 15 dernières années. Chaque point représente un échantillon pour lequel a été calculé la somme des températures moyennes observées durant les 7 jours autour de la floraison (axe des ordonnées). Les lettres indiquent les différences significatives entre les températures moyennes cumulées sur les différentes années (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

De même pour les précipitations, les 7 jours autour de la floraison pour l'année 2016 ont significativement été les plus pluvieux ($p\text{-value} < 0.05$), avec une moyenne des précipitations cumulées de 64 mm, suivis par l'année 2008 avec 53 mm en moyenne ($p\text{-value} < 0.05$; Figure 16). L'année 2022 a été observée comme la moins pluvieuse avec une moyenne de 18 mm de pluies cumulées sur les 7 jours autour de la floraison (Figure 16).

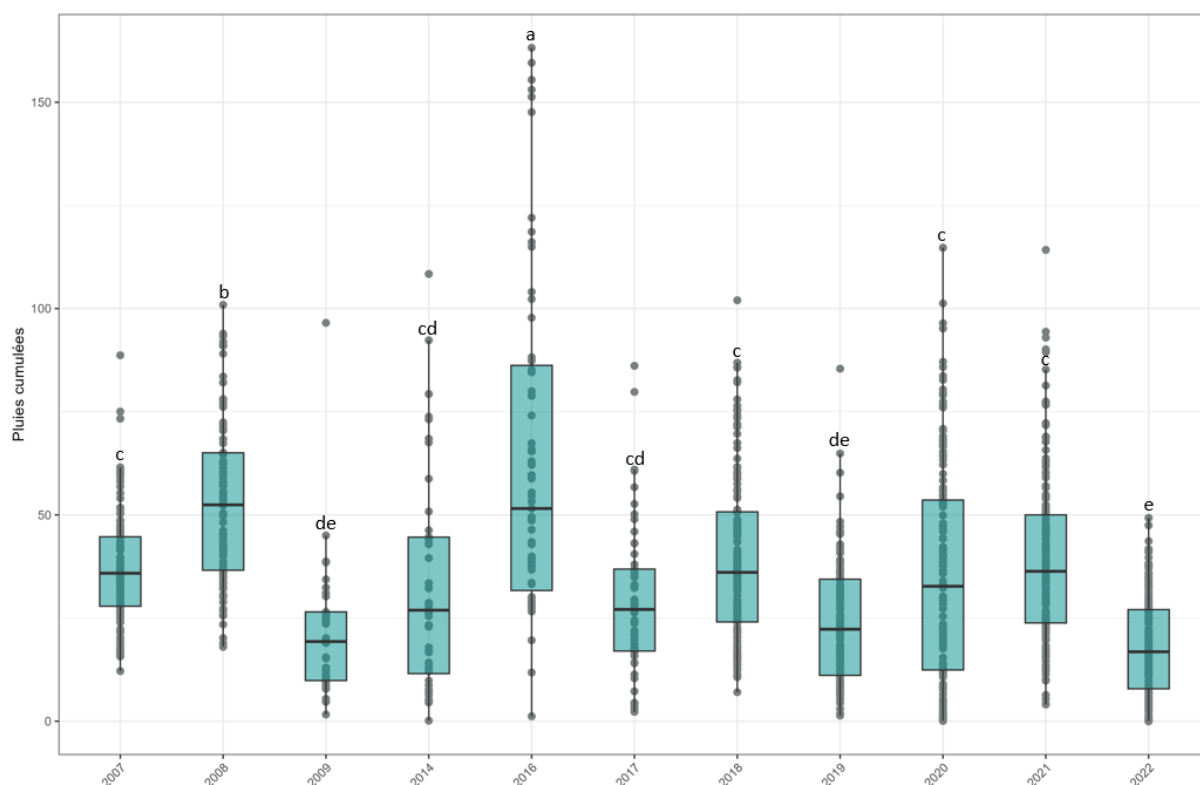


Figure 16 : Récapitulatif de la pluviométrie sur les parcelles échantillonnées sur les 15 dernières années. Chaque point représente un échantillon pour lequel a été calculé la somme des pluies (en mm) durant les 7 jours autour de la floraison (axe des ordonnées). Les lettres indiquent les différences significatives entre les pluies cumulées sur les différentes années (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

5.2. Effet de la température et des précipitations sur les profils de mycotoxines associés aux espèces fusariennes

La température et la pluie n'ont pas été identifiées comme des facteurs ayant un effet significatif ($p\text{-value} > 0.05$) sur les ENN, la FX, le NIV ou la BEA, contrairement à la ZEA, le DON + ADON et les TCTA qui seront donc les seules mycotoxines traitées dans cette partie.

Les corrélations entre les facteurs climatiques étudiés et les mycotoxines sont représentées sur la Figure 17. Nous pouvons d'abord observer la faible, mais significative ($p\text{-value} < 0.05$) corrélation négative entre la pluie et la température, en accord avec une diminution de température sur les jours pluvieux. Nous avons également mis en évidence que seule la température était corrélée aux mycotoxines quantifiées dans les échantillons, l'unique corrélation entre la pluie et la ZEA observée étant négligeable ($r < 0.1$). Toutes les corrélations de la température avec les mycotoxines étudiées ont été identifiées comme significatives ($p\text{-value} < 0.05$). Nous avons ainsi mis en évidence une corrélation positive ($r = 0.14$) entre la température et

le DON, contrairement à ce qui a été observé pour la ZEA et les TCTA où les corrélations étaient négatives ($r = -0.18$ dans les deux cas). Ces résultats suggèrent donc que la ZEA et les TCTA ont plus tendance à être présentes au champ lorsque les températures sont modérées alors que le DON + ADON serait plus présent à des températures plus chaudes. Cette observation est en accord avec la corrélation positive observée entre TCTA et ZEA. Cependant, ces résultats sont à nuancer, les corrélations observées étant faibles (Figure 17). Ces observations soulèvent la difficulté d'étudier l'effet de facteurs environnementaux sur les mycotoxines, étant le résultat de complexes interactions entre de nombreux facteurs. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre les espèces fusariennes majoritaires et les facteurs climatiques.

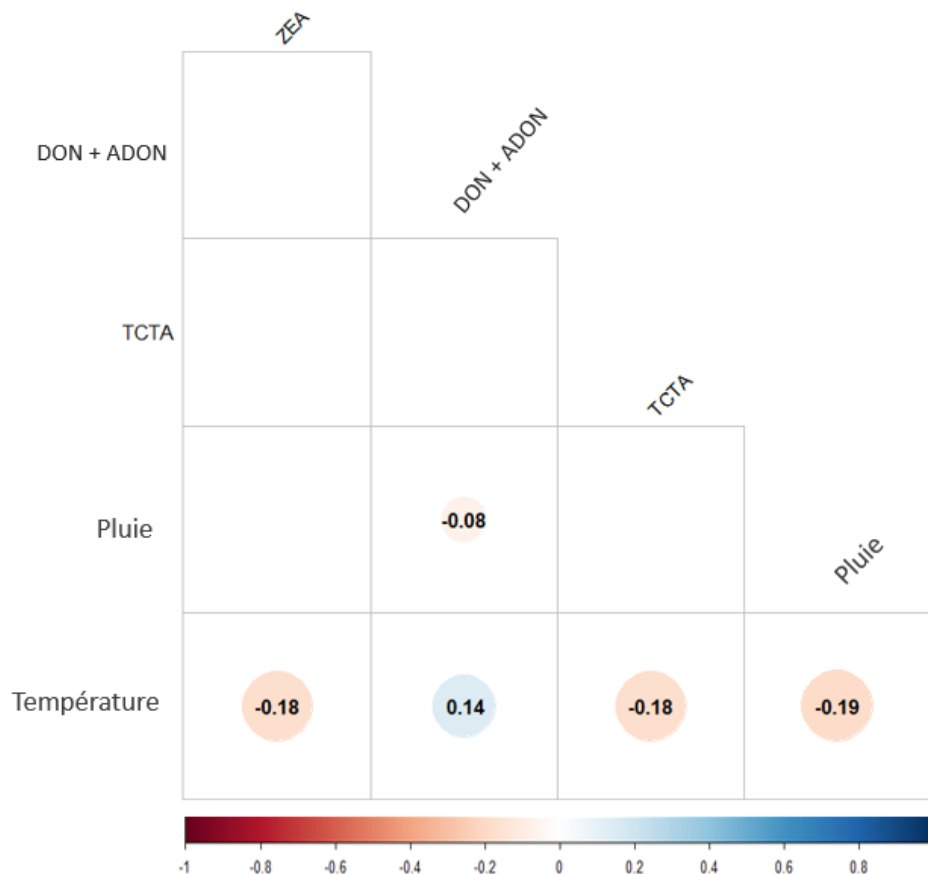


Figure 17 : Matrice des corrélations entre certaines mycotoxines identifiées dans les échantillons environnementaux et les facteurs climatiques. Le coefficient de corrélation de Pearson est indiqué uniquement si la *p-value* est significative (<0.05). Plus la corrélation est forte, plus la taille du cercle est importante. Les corrélations positives tendent vers le bleu et les corrélations négatives vers le rouge. Seuls la ZEA, le DON + ADON et les TCTA sont indiqués car les corrélations avec les autres mycotoxines n'étaient pas significatives.

Conclusions et perspectives du chapitre 1

Dans ce premier chapitre, nous cherchions à répondre à la question suivante : **quelle est l'évolution de la distribution des espèces de *Fusarium* au champ sur les 15 dernières années ?**

L'étude combinée de la distribution des espèces et des profils de mycotoxines associées sur les différentes années, présentant des caractéristiques climatiques différentes, nous a permis de conclure que l'occurrence des espèces fusariennes était stable au cours du temps, avec des différences de prédominance. Cette conclusion est généralement retrouvée dans la littérature, avec par exemple, le développement de *F. poae* qui a largement été démontré comme favorisé au champ par des conditions climatiques sèches et chaudes (Xu et al., 2008; Pancaldi et al., 2010; Covarelli et al., 2015; Boutigny et al., 2019; Nguyen et al., 2024). L'année 2022 ayant été la plus chaude et la plus sèche sur ces 15 dernières années, le remplacement de *F. graminearum* par *F. poae* a bien été observé, également en 2017 sur blé dur spécifiquement. Ces observations soulèvent le risque d'augmentation de l'occurrence de *F. poae* avec le changement climatique. De même, le développement de *F. culmorum* a été décrit comme favorisé par un climat plutôt humide et chaud au moment de la floraison (Bottalico & Perrone, 2002), ce qui correspond avec l'augmentation de sa fréquence observée dans nos échantillons en 2020.

La présence quasi constante de *F. tricinctum* ou de *F. avenaceum* sur les différentes années d'étude suggère un développement stable de ces espèces sous différentes contraintes climatiques. Enfin, la présence accrue de *F. langsethiae* en 2022 pourrait suggérer une préférence de climat chaud et sec pour la contamination du blé au moment de la floraison ce qui n'est cependant pas en accord avec le fait que *F. langsethiae* est souvent retrouvé dans les régions les plus septentrionales (Torp & Nirenberg, 2004; Imathiu et al., 2010; Hjelkrem et al., 2018). Les différences observées entre les études peuvent s'expliquer par d'autres événements climatiques et agronomiques non pris en compte.

A l'issue de ce travail, une base de données unique par sa richesse aussi bien sur les échantillons (nombre, localisation, années) que les données (mycotoxines, ADN) a été

constituée. Une perspective de ces travaux sera d'analyser cette base de données au regard d'autres facteurs environnementaux, climatiques et agronomiques qui permettront de progresser dans l'étude des préférences de contamination par les espèces fusariennes et les mycotoxines associées.

Pour la suite de ce manuscrit, nous chercherons à étudier les caractéristiques écophysiologiques des principales espèces fusariennes identifiées au champ afin de valider les préférences de climat mises en évidence.

CHAPITRE 2 : ÉCOPHYSIOLOGIE DES ESPÈCES FUSARIENNES EN CULTURES *IN VITRO*

Objectifs du chapitre 2

Dans ce deuxième chapitre, nous traiterons des **différentes caractéristiques écophysiological des espèces fusariennes sous contraintes abiotiques**. La question que nous nous poserons tout au long de ce chapitre sera la suivante : **quelles sont les réponses des espèces fusariennes face à différentes pressions abiotiques ?**

Pour ce faire, nous avons étudié les capacités de croissance et de production de mycotoxines des espèces fusariennes majoritaires sous contraintes abiotiques.

Ce chapitre se divisera ainsi en deux grandes parties : *i*) d'abord nous étudierons les caractéristiques écophysiological, en termes de croissance et de production de mycotoxines, de cinq espèces différentes de *Fusarium* en monoculture (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. langsethiae* et *F. tricinctum*), puis *ii*) nous nous intéresserons ensuite à l'étude de ces caractéristiques écophysiological pour *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum* ou *F. poae*. Ces études ont été réalisées en réponse à des variations environnementales de température et d'eau disponible (a_w) dans le milieu de culture.

PARTIE 1 : Écophysiologie des espèces de *Fusarium* en monocultures

L'objectif de cette première partie du Chapitre 2 est de mettre en évidence les différents effets de deux facteurs environnementaux (température et a_w) sur la croissance et la production de mycotoxines des espèces fusariennes en monocultures.

Cette première partie du Chapitre 2 a fait l'objet d'un article scientifique soumis à **Applied and Environmental Microbiology** (AEM). L'article a été accepté avec révisions mineures en janvier 2025. L'article est présenté ci-dessous, tel qu'il a été soumis initialement.

Ecophysiological behaviour of major *Fusarium* species in response to combinations of temperature and water activity constraints

Marie-Anne Garcia^a, Rémi Mahmoud^b, Marie-Odile Bancal^b, Pierre Bancal^b, Stéphane Bernillon^a, Laetitia Pinson-Gadais^a, Florence Richard-Forget^a, Marie Foulongne-Oriol^{a#}

^a INRAE, MYCSA, 33882 Villenave d'Ornon, France

^b Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, EcoSys, 91120 Palaiseau, France

M.A.G. and R.M. contributed equally to this work.

Corresponding author : adress correspondence to Marie Foulongne-Oriol, marie.foulongne-oriol@inrae.fr

Mailing address : INRAE, UR1264 Mycologie et Sécurité des Aliments, bâtiment Qualis, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS 20032, F-33882 Villenave d'Ornon cedex, France

Running title : *Fusarium* spp. behaviours under abiotic constraints

ABSTRACT

Fusarium Head Blight (FHB) is a devastating fungal disease affecting cereals, caused by *Fusarium* species that can produce harmful mycotoxins. *Fusarium* species share the same ecological niche, and their population dynamic and associated mycotoxin patterns are driven by the environment. The aim of the present study was to investigate ecophysiological characteristics of the major *Fusarium* species causing FHB under abiotic factors. Growth and mycotoxin production of different strains of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium tricinctum* were characterized under a combined effect of temperature ($\Theta = 15, 20, 25$ and 30°C) and water activity ($a_w = 0.99, 0.98, 0.97, 0.96, 0.95$ and 0.94). Using innovative statistical analyses, we demonstrated that those *Fusarium* species greatly differ in their responses to the studied environmental constraints. Our findings indicated that Θ , a_w , and their interaction were the major factors with a significant impact on the species behaviour. The intraspecific variation was demonstrated as less pronounced than the interspecific one. Understanding the ecophysiological requirements of *Fusarium* species is crucial in the context of climate change that is predicted to worsen disease outbreaks. Our data constitute a valuable knowledge base for improving the reliability and robustness of FHB prediction models and anticipating the associated mycotoxin risk.

IMPORTANCE

Fusarium species pose a significant threat to major cereal crops, including wheat. These fungi not only reduce yield but also produce mycotoxins harmful to animals and humans. The prevalence of each *Fusarium* species is influenced by environmental conditions and shifts in pathogen populations, leading to changes in mycotoxin patterns have already been observed in relation to climate changes. This study revealed distinct ecophysiological behaviours, including mycelium growth and mycotoxin production, among the five major *Fusarium* species when exposed to varying temperature and water activity conditions. Our findings provide a valuable foundation for a more comprehensive understanding of the challenge of mycotoxin contamination and for the development of more effective mitigation strategies in the near future.

KEYWORDS

Fungal pathogens, climate change, ecological niche, adaptive response, inter/intraspecific diversity, combined effects

INTRODUCTION

Fusarium Head Blight (FHB) is a devastating fungal disease affecting small grain cereals worldwide. FHB is mainly caused by several *Fusarium* species that can produce various mycotoxins harmful to humans and animals. In addition to economic losses due to reduced yield and a lower grain quality, mycotoxin-producing *Fusarium* species also induce important waste due to the downgrading of contaminated batches. Among the species causing FHB in Europe, *Fusarium graminearum* is acknowledged as the key actor. But, *F. graminearum* is never found alone and commonly co-occurs with other *Fusarium* species during infection. *Fusarium avenaceum* and *Fusarium tricinctum* are frequently found associated with FHB (Xu *et al.* 2005; Beccari *et al.* 2018; Vogelgsang *et al.* 2019; Valverde-Bogantes *et al.* 2020; Infantino *et al.* 2023; Dubois and Roucou 2023). Recent works also highlighted the increased occurrence of other species in Europe such as *Fusarium poae* or *Fusarium langsethiae* (Osborne and Stein 2007; Valverde-Bogantes *et al.* 2020; Infantino *et al.* 2023; Dubois and Roucou 2023). Each *Fusarium* species has its own mycotoxin profile. *F. graminearum* is a well-known producer of type B trichothecenes (TCTB) including DON and its acetylated derivatives (3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 15-ADON), nivalenol (NIV) and of zearalenone (ZEA) (Van Der Lee *et al.* 2015). *F. langsethiae* and *F. poae* produce type A trichothecenes (TCTA) including diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 and HT-2 (Kokkonen *et al.* 2012; Dinolfo and Stenglein 2014) but *F. poae* can also produce TCTB (NIV and fusarenon-X (F_x)) as well as enniatins (ENN). *F. avenaceum* and *F. tricinctum* are enniatins (enniains A (ENNA), ENNA1, ENNB and ENNB1) and beauvericin (BEA) producers (Gautier *et al.* 2020). All these *Fusarium* mycotoxins are known for their cytotoxic effect (Langseth *et al.* 1999), especially TCTB and TCTA, which are reported to be immunosuppressive and inhibit the synthesis of proteins in eukaryotes (Cundliffe *et al.* 1974; Ueno and Matsumoto 1975; Cundliffe and Davies 1977; Eudes *et al.* 2000; Steinmetz *et al.* 2009; Knutsen *et al.* 2017). ZEA is oestrogenic, *i.e.* it affects fertility and reproduction (Fink-Gremmels and Malekinejad 2007). The toxic effects of ENN and BEA are related to their ionophoric properties and therefore their capacity to affect the integrity of biological membranes (Mallebrera *et al.* 2018). In Europe, most of these mycotoxins are covered by regulations fixed by the European legislation. Maximum levels and guidance values for mycotoxins in cereals are constantly evolving due to new knowledge in toxicology and occurrence data but also to shifts in FHB pathogen populations associated with changes in mycotoxins contaminating crops (Pinotti *et al.* 2016).

Climate change is likely to deeply impact global food safety. One of the major concerns is the increasing risk of human exposure to mycotoxins (Garcia-Cela *et al.* 2018; Kos *et al.*

2023). Several studies have already demonstrated that climate change has led to substantial fluctuations in the distribution of FHB pathogens and the associated-mycotoxins profiles (Osborne and Stein 2007; Valverde-Bogantes *et al.* 2020). Changes in the prevalence of one *Fusarium* species over the others, together with the subsequent major mycotoxin contaminating harvest, are becoming more common in Europe (Beyer *et al.* 2014, Covarelli *et al.* 2015; Van Der Lee *et al.* 2015; Banik *et al.* 2018; Nogueira *et al.* 2018; Valverde-Bogantes *et al.* 2020). Understanding the biological and climatic factors influencing *Fusarium* populations is crucial for effectively managing FHB and mycotoxin risks

Previously mentioned studies indicated that, despite the ability of *Fusarium* species to occupy the same ecological niche and share the same biotic and abiotic environment, their intrinsic ecophysiological requirements could exhibit slight differences. This could potentially result in differential adaptive capacities in response to changing niche conditions, thereby driving the installation of the fittest species. In addition, *Fusarium* species are able to produce a large arsenal of secondary metabolites, including mycotoxins, which may confer competitive advantage during niche colonisation (Fox and Howlett 2008; Audenaert *et al.* 2013).

Several studies have investigated the *in vitro* responses of the predominant *Fusarium* species under abiotic constraints, mainly temperature and water activity, with a particular focus on growth and mycotoxin production (Hope *et al.* 2005; Nazari *et al.* 2014; Verheecke-Vaessen *et al.* 2022). Overall, those studies suggested that each species exhibits a distinctive response signature and that within a given species, optimal conditions required for mycelium growth and mycotoxin production are most often different. For example, 25°C is the optimal temperature for growth and DON production by *F. graminearum* (Hope *et al.* 2005), while *F. langsethiae* produce HT-2 and T-2 optimally between 15 and 35°C (Nazari *et al.* 2014). Knowledge about the way that abiotic parameters modulate fungal development and mycotoxin production of minor *Fusarium* species is much more limited (Gautier *et al.* 2020). Besides, the currently available data have been obtained using quite different experimental conditions (culture media or abiotic factors), mostly using only one or two strains per species which doesn't allow to assess the adaptation capacity of the different species and speculate which species will be more suited to a particular environment.

To investigate the aforementioned knowledge gaps, the present work aimed to study the combined effect of environmental factors (temperature Θ and water activity a_w) on the growth of the five most frequently encountered *Fusarium* species (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum*) in European harvests and on their respective mycotoxin production. Twenty-four combinations of Θ (15, 20, 25 and 30°C) and a_w (0.94, 0.95, 0.96,

0.97, 0.98 and 0.99) were tested and five strains of each *Fusarium* species were considered. The probability of growth was assessed for each *Fusarium* species, and calibrated logistic growth curves tailored to each species and strain were calculated. The impact of different factors (Θ , a_w , inter/intra-specific variability) on the growth's curves parameters were investigated. Additionally, the same abiotic factors (a_w and Θ) were tested for their effect on mycotoxin production which was considered as a binary response (presence or absence). Finally, correlations between growth parameters and mycotoxin production were studied. The present study will provide essential insights that will allow anticipating the future shifts in *Fusarium* species distribution and mycotoxin patterns as a result of environmental changes.

RESULTS

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON GROWTH

FREQUENCY OF GROWTH AND GROWTH PARAMETERS IN RESPONSE TO A_w AND Θ FACTORS

Growth frequency (f_g) and growth parameters (the time at the inflection point τ , the carriage capacity K , the relative growth rate r and the maximal growth rate V_{max}) estimated under different a_w and Θ variations for the five strains of the five studied *Fusarium* species are shown in Figure 1. Overall, data evidenced that, when growth occurred, the K , τ , r and V_{max} parameters followed different patterns depending on the species, strains and the environmental factors (a_w , Θ).

When considering first the growth frequency (f_g), highest values (reached $f_g = 1$) were obtained at $\Theta \geq 25^\circ\text{C}$ and $a_w > 0.94$ whatever the *Fusarium* species. Overall, fungal growth was occurring in 2672 out of the 3600 inoculated wells. Considering all species and conditions, *F. poae* and *F. avenaceum* exhibited the highest number of wells with detected fungal growth (80%), while *F. graminearum* was the least successful (66%). The highest heterogeneity in f_g was observed for the six a_w levels, at $\Theta \leq 20^\circ\text{C}$ (Figure 1). Growth frequency (f_g) data reported in Figure 1 also revealed the intraspecific variation of *Fusarium* in responses to environmental changes.

Concerning the τ_{mean} parameter, values determined for all studied *Fusarium* species and strains were, on average, the highest at 15°C ($\tau_{mean} = 15.8$ days). These values gradually decreased when temperature increased to reach an average of 5.76 days at 30°C . On Figure 1,

it could also be noticed, that, with few exceptions, decreasing a_w led to an increased in τ_{mean} . This pattern was particularly apparent for the 15°C, 20°C and 25°C conditions.

For most of the studied *Fusarium* species, K values were highest at 20°C or 25°C (Figure 1). The highest K values were observed for *F. graminearum*. Overall, K was shown to decrease with a_w . For example at $\Theta = 25^\circ\text{C}$, a four-fold decrease in the K value of *F. graminearum* was observed when a_w decreased from 0.99 to 0.94 (K = 0.98, 0.83, 0.78, 0.62, 0.45 and 0.24 at $a_w = 0.99, 0.98, 0.97, 0.96, 0.95$ and 0.94, respectively; Figure 1). Surprisingly, very high K values were fitted for *F. tricinctum* at quite challenging environmental conditions, *i.e.* K = 1.46 at $\Theta = 15^\circ\text{C}$, $a_w = 0.95$ and K = 0.66 and 0.84 at $\Theta = 20^\circ\text{C}$, $a_w = 0.94$ and 0.95, respectively. However, such an observation has to be considered as a mathematical artefact since under the former conditions, *F. tricinctum* showed a delayed growth ($\tau > 25$ days) exceeding the duration of the experiment. Indeed, the fitted K could not be seen as indicative of observed growth when the τ value was too high ($\tau > 25$ days), as maximal OD was never reached during the experimentation (Figure 1, Figure 3).

Regarding the r parameter, its value significantly increased ($p\text{-value} < 0.05$) with Θ ($r_{\text{mean}} = 0.37, 0.53, 0.77$ and 0.82 $\text{OD}_{\text{unit}}\cdot\text{days}^{-1}$ ($\text{ODU}\cdot\text{D}^{-1}$) at 15, 20, 25 and 30°C, respectively; Figure 1). Moreover, for growth conditions with $a_w < 0.97$, no significant difference between r parameter values determined for each *Fusarium* species was observed ($p\text{-value} > 0.05$).

Whatever the considered species, the Vmax parameter globally increased with Θ , until 25°C, while a slight decrease was noted at 30°C ($V_{\text{max}_{\text{mean}}} = 90$ and 75 $\text{mODU}\cdot\text{D}^{-1}$ at 25°C and 30°C, respectively). Among all the studied species, *F. graminearum* was the fastest-growing species with $V_{\text{max}_{\text{mean}}} = 97, 198, 122$ and 92 $\text{mODU}\cdot\text{D}^{-1}$ at 15, 20, 25 and 30°C, respectively (Figure 1). On the contrary, *F. avenaceum* and *F. tricinctum* were the slowest-growing species with $V_{\text{max}_{\text{mean}}} = 74$ and 72 $\text{mODU}\cdot\text{D}^{-1}$ at 25°C or $V_{\text{max}_{\text{mean}}} = 32$ and 37 $\text{mODU}\cdot\text{D}^{-1}$ at 15°C, respectively. Overall, the Vmax parameter increased slightly with a_w . Interestingly, at $\Theta = 20^\circ\text{C}$ and 25°C, the Vmax values assessed for *F. graminearum* showed a 4-fold and 2-fold decrease respectively between a_w 0.99 and 0.94.

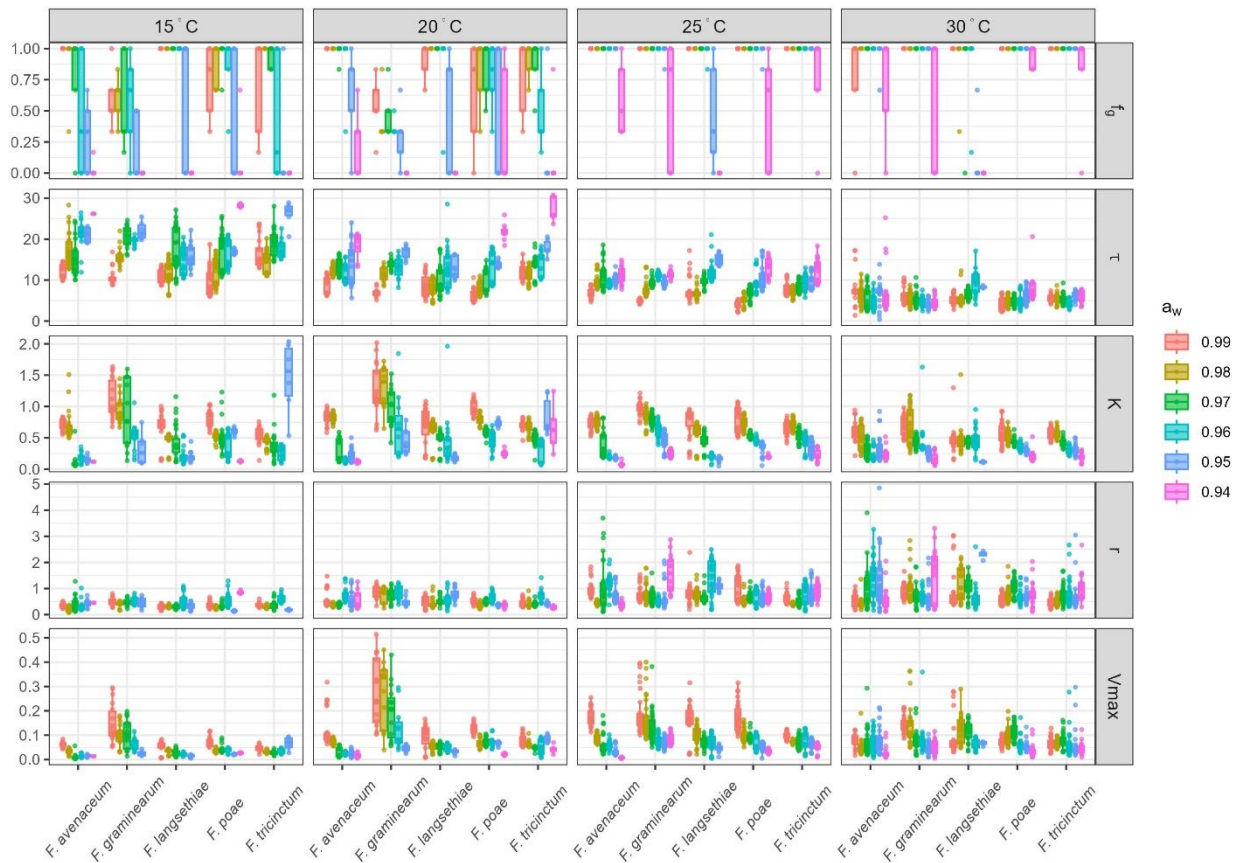


Figure 1: Growth frequency (f_g) and growth parameters (τ , K , r and V_{max}) for the five *Fusarium* species, according to environmental variation. Growth frequency (f_g , expressed without unit) and growth parameters (τ expressed in days, K without unit, r and V_{max} in $OD_{unit} \cdot days^{-1}$) in lines, were estimated on 5 different strains per species (*F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum*, on the x-axis). Four different Θ (15, 20, 25 and 30°C, showed in columns) and six levels of a_w (0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99) were tested. Each dot represents the mean frequency of the 6 replicates for each strain and the boxplots show the intraspecific diversity within the 5 species.

PROBABILITY OF GROWTH : SPECIES EXHIBIT CONTRASTED RESPONSES TO A_w AND Θ FACTORS

The five *Fusarium* species exhibited different growth responses to environmental variations. To investigate the specific effects of a_w and Θ factors on growth parameters, mycelium growth was modelled. The probability model with the lowest Bayesian information criterion (BIC) reached an accuracy of 83%. As appeared in Figure 2, *F. langsethiae* displayed a distinct behaviour compared to the other species. Indeed, its growth probability (p_g) strongly decreased at low a_w while minimally affected by Θ . *F. langsethiae* appeared more adapted to lower temperature and higher water availability. On the other hand, p_g of the other species

varied both with a_w and Θ . For *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* and *F. tricinctum*, p_g exceeded 90% only when Θ exceeded 25°C and a_w reached 0.97 (Figure 2). Moreover, *F. graminearum* appeared as the less robust; at 15°C and 20°C, its growth probability was lower than that of any other *Fusarium* species at all tested a_w levels.

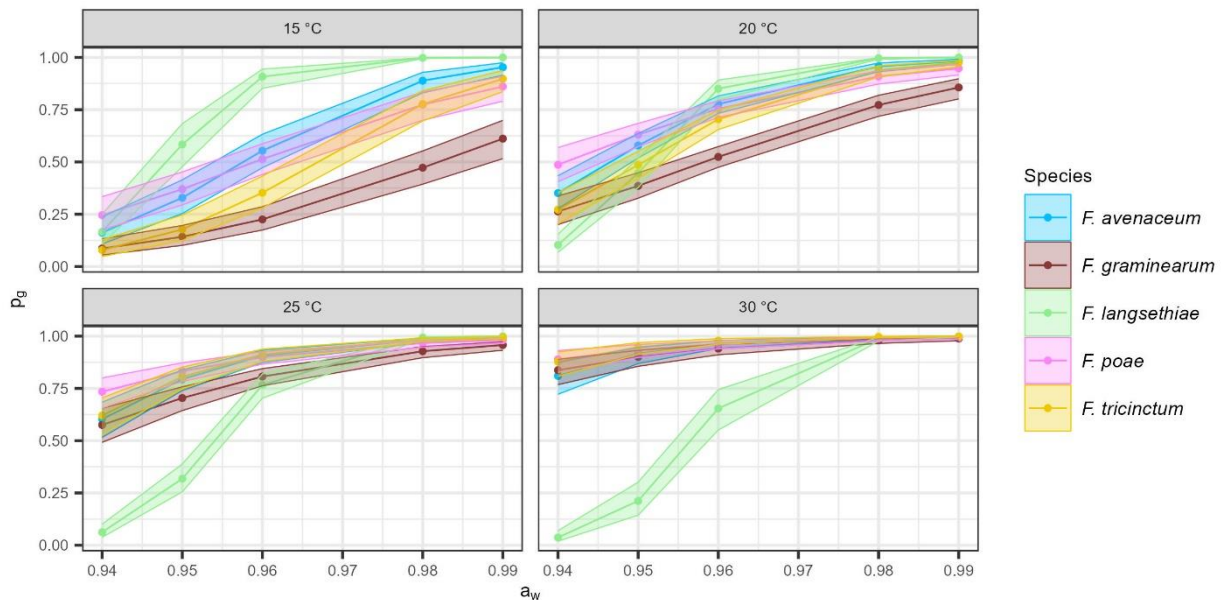


Figure 2: Modelling growth probability with logistic regression for the five *Fusarium* species, according to environmental variation. Growth probability (p_g , on the y-axis) was estimated by the optimal logistic regression model ($\text{logit}(p_g) = \beta_0 + (\beta_1 + \beta_{1i}) \cdot \Theta_i + (\beta_2 + \beta_{2i}) \cdot a_{wi} + \beta_{3i} \cdot fs_i$) against four Θ (15, 20, 25 and 30°C, on each box) and at six levels of a_w (0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99; on the x-axis). Each dot represents the p_g of the five *Fusarium* strains for each species. Confidence intervals (95%) are represented by shading around the curves.

GROWTH PARAMETERS OF SPECIES ARE DIFFERENTIALLY DRIVEN BY $A_w \times \Theta$ CONDITIONS

Quadratic models, with the parameter as response variable and a_w and Θ as covariates were applied for each studied *Fusarium* species and allowed us to establish response curves shown in Figure 3.

Our data indicated a significant increase in time to reach the inflection point (τ) in response to lower temperature ($\Theta \leq 20^\circ\text{C}$) and reduced a_w , regardless of the species ($p\text{-value} <$

0.05). Indeed, τ values were maximal at low Θ , with little influence of either a_w or species (Figure 3).

In contrast, the carriage capacity (K) values were maximal at high a_w levels, with little or no influence of Θ (Figure 3). The quadratic model was unable to correctly fit the K observed values for *F. tricinctum* because of the challenging estimation of this parameter for this species (as described above, in the “Growth parameters and frequency of *Fusarium* species in response to a_w and Θ factors” section).

The relative (r) and maximum (Vmax) growth rates also exhibited a different response to a_w and Θ depending on the fungal species (Figure 3). The r parameter values assessed for *F. avenaceum*, *F. poae* and *F. tricinctum* were maximal at $\Theta \geq 25^\circ\text{C}$, regardless of the a_w . For *F. langsethiae*, the maximum r values were observed at $\Theta \geq 25^\circ\text{C}$ and low a_w . The r parameter related to *F. poae* showed a dependence on Θ only. By contrast, *F. graminearum* showed a complex pattern, with a combined effect of Θ and a_w at $a_w = 0.97$ only, together with a strong effect of extreme a_w (0.95 and 0.99).

The Vmax parameter significantly increased with a_w levels ($p\text{-value} < 0.05$), with maximal values at high a_w , for all the Θ or all species (Figure 3). Temperatures below 20°C were shown to considerably and negatively affect the Vmax parameter for the whole set of studied species.

As appeared in Figure 3, regardless of the considered species, the results showed an increase in τ , and a decrease in K and/or r and Vmax rates under challenging conditions. In any case, growth was promoted by $a_w \geq 97\%$.

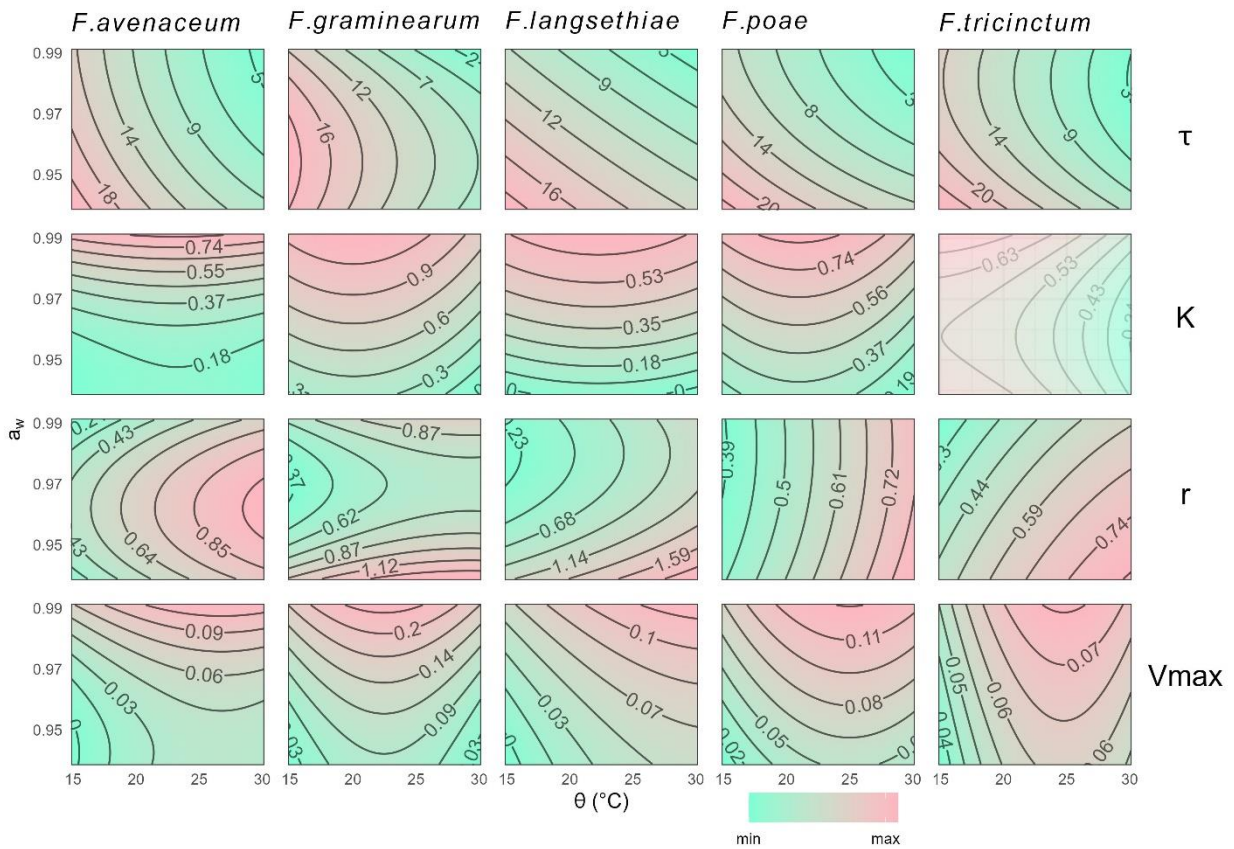


Figure 3: Response surface plots of growth parameters values for the five *Fusarium* species, according to combined abiotic conditions (a_w and Θ). Contour plots of growth parameters (τ , K , r and V_{max} in line) were estimated using quadratic models for each *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum* in column), as a function of a_w (y-axis) and Θ (x-axis). Only grown replicates were considered. Each response surface has its own scale, this is indicated by numbers on the lines of the contour plot. The contour plot of K for *F. tricinctum* is shaded because the model did not fit correctly the response curves for this species.

INTERSPECIFIC DIVERSITY HAS ONLY A SLIGHT EFFECT ON GROWTH PARAMETERS, COMPARED TO ENVIRONMENTAL FACTORS

The above results demonstrated different growth responses between *Fusarium* species. However, how growth variability is distributed between species, strains and environmental factors (a_w , Θ) needs further investigation. The variance partitioning represented in the Figure 4 showed that the studied factors (a_w , Θ , species and their interactions) explained 89%, 77% and 73% of the total variance of τ , K and V_{max} parameters, respectively. The remaining 11%,

23% and 27% were explained by the residual. A different pattern was observed for r with 52% of the total variance explained by the residual against only 48% by the factors studied. The effect of environmental factors (a_w , Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$) on the total variance of each growth parameter was predominant and highly significant ($p\text{-value} < 0.05$, see Supplementary Table 2). Nevertheless, the respective contribution of a_w , Θ and their interaction ($a_w \times \Theta$) to the total variance depends heavily on the measured growth parameter. On the other hand, the species factor alone and its interactions with a_w and Θ explained only 3%, 11%, 8% and 12% of the total variance of τ , K , r and V_{max} respectively; the species factor alone was never significant except for K (see Supplementary Table 2).

Our data indicated that Θ and $a_w \times \Theta$ interaction factors were the main contributors to the variance of the time to reach inflection point (τ), explaining 40% and 34% of the total variance, respectively, whereas the contribution of a_w factor alone was limited to 11% (Figure 4, see Supplementary Table 2).

The variance of the carriage capacity (K) was explained for 40% and 25% by a_w and $a_w \times \Theta$ interaction, respectively. The Θ factor alone contributed only very slightly (less than 2%) to the K variance (Figure 4, see Supplementary Table 2).

The main factor contributing to the relative growth rate (r) variance was Θ with 26% of the variance explained, followed by a_w and $a_w \times \Theta$ factors that accounted for 6% and 8%, respectively (Figure 4, see Supplementary Table 2). But, as mentioned above, the residual contributed to half of the variance.

The maximum growth rate (V_{max}) variance was shown to considerably depend on $a_w \times \Theta$ interaction that explained 46% of the variance, while a_w and Θ factors alone accounted only for 9% and 5%, respectively (Figure 4, see Supplementary Table 2).

Altogether, the results reported in Figure 4 allowed to identify some trends related to the impact of environmental factors and their interaction on considered growth parameters. K parameter was mainly affected by a_w . τ and r were mainly dependent on Θ , while $a_w \times \Theta$ interaction contributed importantly to the variance of all parameters.

Surprisingly, species factor and its interactions with abiotic factors contributed only to a low percentage of the variance regardless of the growth parameters. However, as strain factor was nested within the species factor, the interspecific and intraspecific effects on variance were not distinguishable.

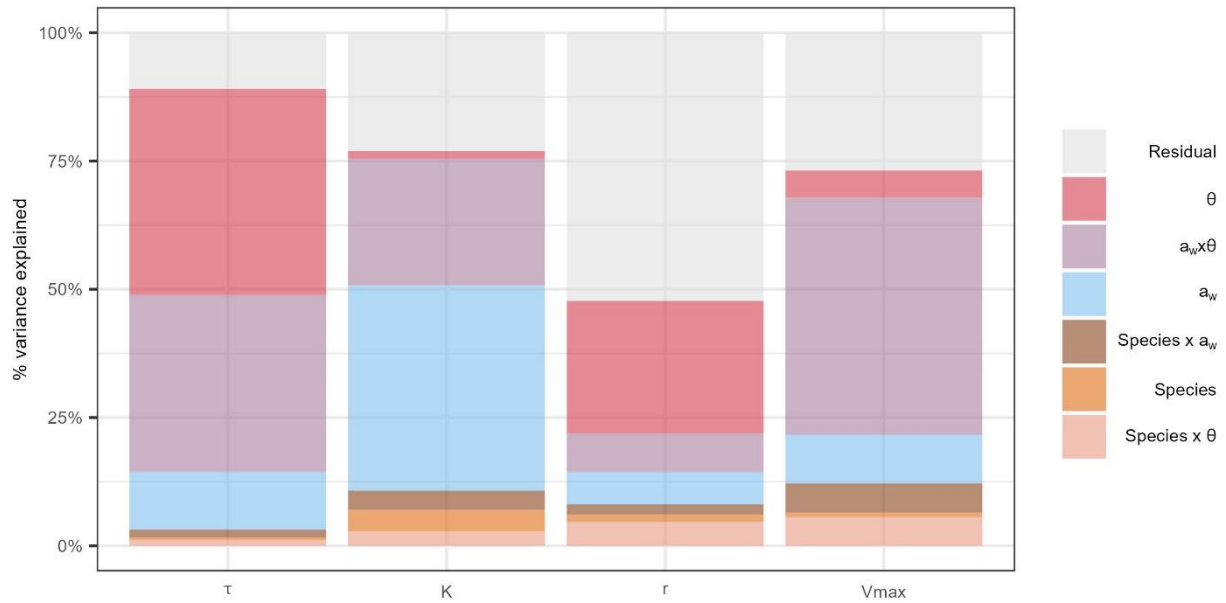


Figure 4: Variance partitioning of growth parameters (τ , K , r and V_{max}) according to species, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions. The percentage of variance explained (y-axis) by different factors (in colours) for each growth parameter (x-axis) was estimated on grown replicates only. Environmental factors (a_w and Θ), their interaction ($a_w \times \Theta$), species factor and its interactions with environmental factors (Species $\times a_w$ and Species $\times \Theta$) are represented in colours. The strain factor was nested within the species factor.

INTRASPECIFIC DIVERSITY AFFECTS MORE GROWTH PARAMETERS THAN INTERSPECIFIC DIVERSITY

The Figure 5 reports the contribution of both intraspecific (strain factor) and interspecific (species factor) variability to the variance of the growth parameters for each of the a_w and Θ combinations. For a_w values higher than 0,97, the intraspecific diversity accounted for more than 45% of the total variance, while interspecific diversity contributed for 30%, regardless of the environmental conditions.

In contrast, for a_w values lower than 0.97, intraspecific variability contributed less to the variance of growth parameters and the effect of the species factor appeared to be more pronounced than the strain factor. For example, 82% and 79% of the V_{max} variance was respectively explained by interspecific variability at $a_w = 0.95$ and $\Theta = 15^\circ\text{C}$ or $\Theta = 20^\circ\text{C}$ (Figure 5).

The residual variance, not explained by the species or the strain, contributed nearly to 24% of the total variance, this percentage increasing in the less favourable growth conditions (15°C and 30°C). In some cases, the residual effect was even stronger than intra- or interspecific effect. For instance, the whole variance of the K parameter was explained by residuals at $\Theta = 15^\circ\text{C}$ and $a_w = 0.94$ (Figure 5). However, as mentioned before, estimating the K parameter becomes challenging under severe abiotic constraints, such as $a_w = 15^\circ\text{C}$ and $a_w = 0.94$ because of a high τ value, preventing the plateau from being reached during the experimentation.

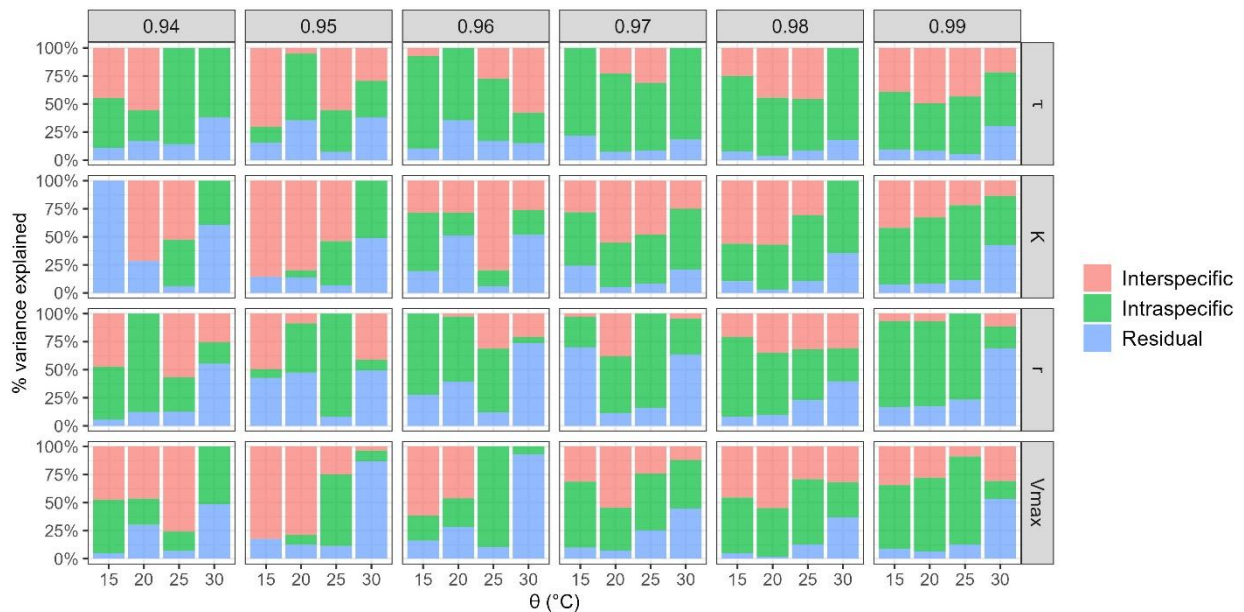


Figure 5: Variance partitioning of growth parameters (τ , K, r and Vmax) according to intraspecific and interspecific diversity. Four different Θ (15, 20, 25 and 30°C, x-axis) and six levels of a_w (0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99, in column) were tested to assess the effect of interspecific and intraspecific diversity on the total variance (y-axis).

INTRASPECIFIC EFFECT IS DIFFERENT BETWEEN SPECIES

Previous results showed a greater effect of the intraspecific diversity on growth parameters, compared to interspecific diversity. The distribution of variability in growth parameters was further studied, taking into account both strain and environmental factors (a_w , Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$).

Intraspecific variance of growth parameters is reported on Figure 6 for each studied *Fusarium* species. It clearly appeared that this variance was significantly impacted by Θ , a_w and $a_w \times \Theta$ interaction and that the contribution of the previous factors differed according to the species.

Regardless of the species or the studied growth parameter, the proportion of variance explained by the strain factor and its interactions with abiotic factors never exceeded 40%.

F. avenaceum growth parameters variance strongly depended on environmental factors and their interaction. Indeed, these factors accounted for 94%, 96%, 87% and 91% of the variance of τ , K, r and Vmax variances, respectively (Figure 6b, see Supplementary Table 3). Moreover, the strain factor and interactions contributed only to 6%, 4%, 11% and 8% of the variance (Figure 6b, see Supplementary Table 3).

In the case of *F. graminearum*, environmental factors (a_w and Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$) accounted for 98%, 78%, 57% and 61% of the total variance of τ , K, r and Vmax parameters, respectively, while the strain factor and its interactions contributed to 2%, 21%, 40% and 38% (Figure 6a, see Supplementary Table 4). This predominant effect of a_w , Θ and $a_w \times \Theta$ was particularly evident for τ parameter. By contrast, the strain factor and interactions with a_w and Θ contributed to a higher percentage of the variance for r and Vmax parameters.

When growth parameters of *F. langsethiae* followed globally the same pattern, *i.e.* a_w , Θ and $a_w \times \Theta$ strongly contributing to the variance, regardless of the growth parameter (83%, 71%, 88% and 81% for τ , K, r and Vmax, respectively; Figure 6c, Supplementary Table 5), the strain factor and its interactions accounted for a large part of the variance. This was particularly the case for K and Vmax, for which 29% and 18% of their variance was explained by the strain factor and its interactions, respectively (Figure 6c, see Supplementary Table 5).

Considering *F. poae*, environmental factors and their interaction contributed to 84%, 90%, 75% and 91% of the variance of τ , K, r and Vmax parameters, respectively, underlining a small contribution of strain factor and its interactions (Figure 6d, see Supplementary Table 6). Indeed, these factors never explained more than 24% of the total variance, regardless of the parameter.

For *F. tricinctum*, a_w , Θ and $a_w \times \Theta$ contributed to 93%, 85%, 59% and 67% of the variance of τ , K, r and Vmax, respectively, whereas strain factor and its interactions with a_w and Θ accounted for 7%, 14%, 40% and 31% (Figure 6e, see Supplementary Table 7). The predominant effect of environmental factors and their interaction was particularly observed for τ while r and Vmax parameters were also strongly influenced by the strain factor and its interactions.

Overall, environmental factors and their interaction on growth parameters were characterized by a higher impact than the strain factor regardless of the studied species. However the weight of intraspecific variation was different between *Fusarium* species. Indeed, the intraspecific effect was particularly pronounced on growth parameters of *F. graminearum*

and *F. tricinctum* while *F. langsethiae* and *F. poae* were less impacted. On the other hand, the intraspecific effect had almost no effect on growth parameters of *F. avenaceum*.

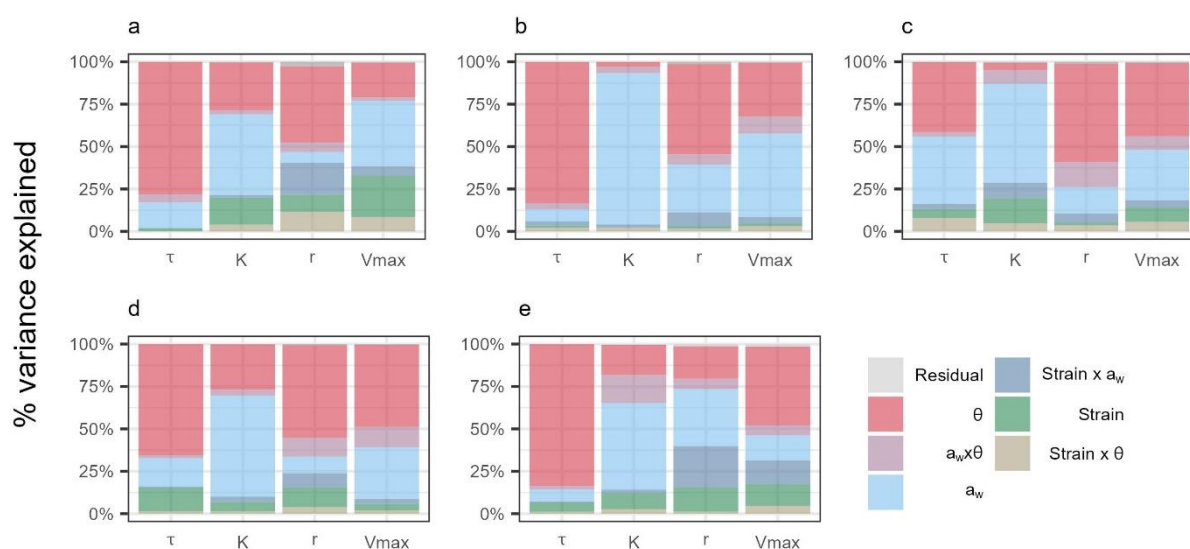


Figure 6: Variance partitioning of growth parameters (τ , K , r and V_{max}) for the five *Fusarium* species, according to strain, environmental factors and their interactions. The percentage of variance (y-axis) explained by different factors (in colours) for each *Fusarium* species studied: (a) *F. graminearum*, (b) *F. avenaceum*, (c) *F. langsethiae*, (d) *F. poae* and (e) *F. tricinctum*. Environmental factors (a_w and Θ), their interaction ($a_w \times \Theta$), strain factor and its interactions with environmental factors ($\text{Strain} \times a_w$ and $\text{Strain} \times \Theta$) are represented in colours.

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON MYCOTOXIN PRODUCTION

THE CAPACITY OF SPECIES TO PRODUCE MYCOTOXIN IS DIFFERENTIALLY IMPACTED BY A_w AND Θ FACTORS

The Figure 7 showed that our experimental conditions allowed the production of measurable amounts of mycotoxins by each of the studied species and strains for a_w values higher than 0.95 with the exception of some strains of *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. poae* and *F. tricinctum*, grown at 25°C or 30°C. All strains of *F. graminearum* were able to produce TCTB but with a large intraspecific variability; for example, at $\Theta = 25^\circ\text{C}$ and $a_w = 0.99$, *F. graminearum* strains produced between 24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 20128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of TCTB (see Supplementary Figure 3). The amounts of quantified mycotoxins at a_w 0.99 indicated that *F.*

graminearum produced more TCTB as the Θ raised (Figure 7). Only the 30°C temperature allowed the production of TCTB at $a_w = 0.97$ and 0.95, the amount strongly decreasing at low a_w (Figure 7).

All strains of *F. avenaceum* and *F. tricinctum* produced enniatins in the experimental conditions used throughout this study, the produced amounts varying according to the strain. ENNB (representing 90% and 60% of total enniatins for *F. avenaceum* and *F. tricinctum*, respectively) and ENNB1 (9% and 32%) were the predominant quantified mycotoxins, whatever the Θ or a_w (see Supplementary Figure 3). These two species tended to produce more ENN as the Θ raised (Figure 7). The highest levels of ENN were quantified at $a_w = 0.99$, 25°C and 30°C. Some ENNs were also quantified in cultures of *F. avenaceum* at $a_w = 0.97$ but only at 30°C (Figure 7). In contrast, the conditions allowing the production of ENNs by *F. tricinctum* were less stringent since measurable amounts of ENNs were observed at $a_w = 0.97$ under 20, 25 and 30°C, and even at $a_w = 0.95$ and 30°C.

Regarding *F. poae*, this species was able to produce mycotoxins belonging to three families (see Supplementary Figure 3) : TCTB (FX), TCTA (DAS and T-2) and ENN (ENNB and ENNB1). A significant correlation ($\rho = 0.8$, $p\text{-value} < 0.05$) was observed between TCTB and TCTA, but none with ENN (for example, between TCTA and ENN, $\rho = 0.33$, $p\text{-value} = 0.38$). Indeed, the conditions promoting the production of ENN differed from that of TCTs. DAS was the sole mycotoxin produced above the limit of quantification (QL) by the five *F. poae* strains at all Θ . When the a_w was set at 0.99, the highest production of DAS was observed at low Θ (15°C and 20°C, Figure 7), while at $a_w = 0.97$ and 0.95, the amount of DAS increased with Θ ($a_w = 0.97$ at 20, 25 and 30°C ; and $a_w = 0.95$ at 30°C).

All *F. langsethiae* strains were shown to produce TCTA, with the exception of the I508 strain. This strain was also characterized by a weak growth compared to the other strains (data not shown). T-2 was the major produced mycotoxin (78% of the total TCTA), while DAS (14% of TCTA) and HT-2 (8% of TCTA) were quantified in smaller amounts. T-2, HT-2 and DAS were detected at $a_w = 0.99$ under all the tested temperature conditions, the highest amounts being observed at low Θ (15 and 20°C, Figure 7). At $a_w 0.97$, a low level of TCTA was quantified at 15°C only.

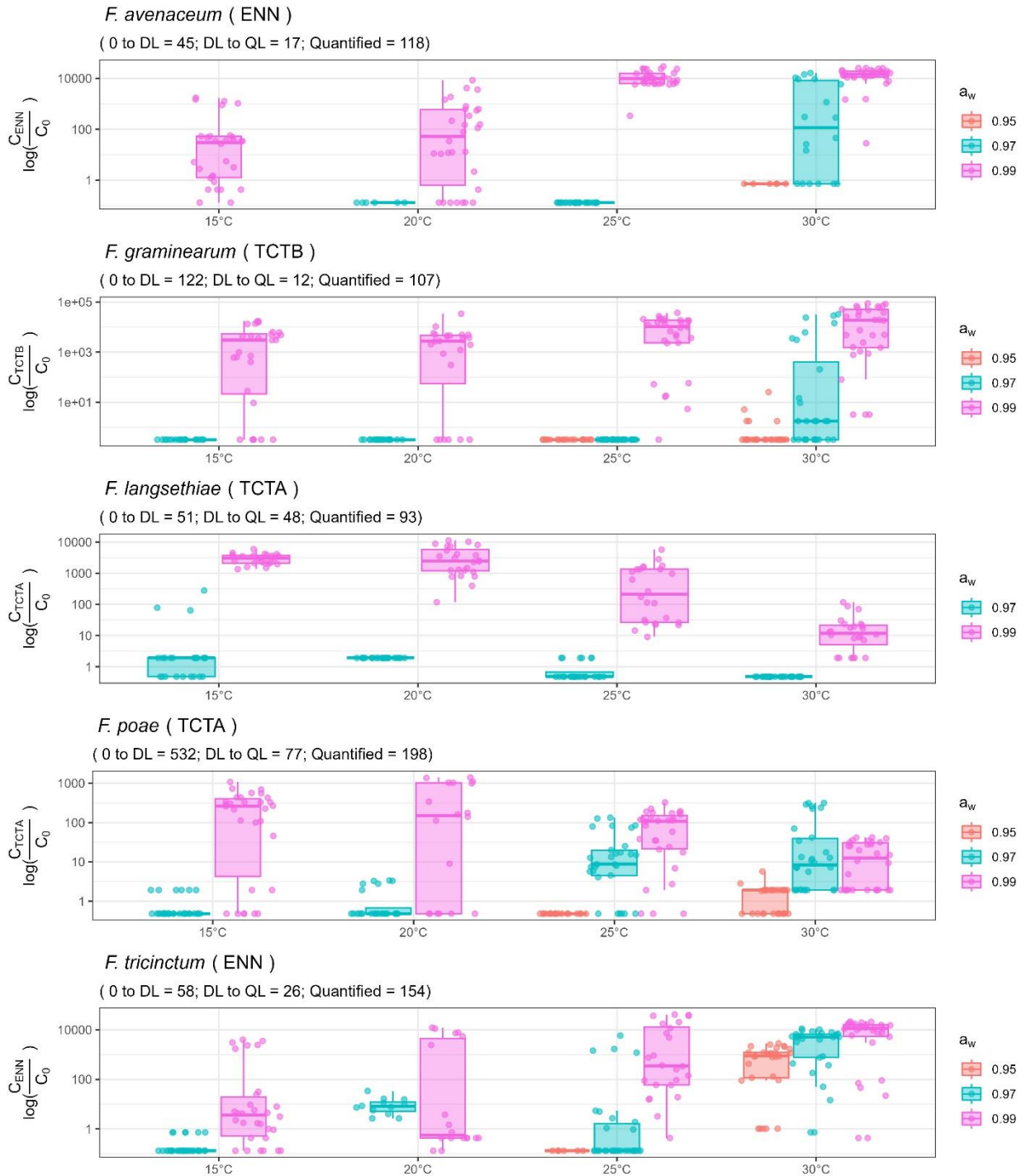


Figure 7: Mycotoxin production by the five *Fusarium* species under environmental variation. Each *Fusarium* species produced a specific class of mycotoxins which are quantified (ENN for *F. avenaceum* in box 1, TCTB for *F. graminearum* in box 2, TCTA for *F. langsethiae* and *F. poae* in boxes 3 and 4, respectively, and ENN for *F. tricinctum* in box 5). Mycotoxins produced (log-transformed, y-axis) were analysed at four Θ (15, 20, 25 and 30°C, x-axis) and three a_w levels (0.95, 0.97 and 0.99, in colours). Each dot represents one

replicate and the boxplots show the intraspecific diversity in terms of mycotoxin production within each *Fusarium* species. 0 to DL corresponds to the number of grown replicates in which the mycotoxins were not detected (concentration below the limit of detection (DL)). DL to QL corresponds to the number of grown replicates in which the mycotoxins were detected but not quantified because they were below the lower limit of quantification (QL). QL corresponds to the number of grown replicates where the mycotoxins were quantified and shown in these boxplots.

PROBABILITY OF MYCOTOXIN PRODUCTION ACCORDING TO ENVIRONMENTAL FACTORS AND SPECIES

Previous results showed that the five *Fusarium* species studied have different abilities for mycotoxin production. The frequency of measurable mycotoxins levels was studied in the subset of samples incubated at a_w 0.97 and 0.99 and $\Theta = 15^\circ\text{C}$, 20°C , 25°C and 30°C , thus amounting 699 measurements over 989 grown replicates (see Supplementary Figure 4). Mycotoxins were detected in 71% of the total inoculated wells. Only 57% of *F. graminearum* samples contained mycotoxins, compared to 74% for the four other species. Fitting mycotoxin frequency to the logistic regression model indicated that Θ , a_w and *Fusarium* species factors had significant effects, as well as their interactions (Figure 8).

The probability of mycotoxin production (p_p) for each studied species is reported in Figure 8. As a general pattern, p_p increased with a_w and Θ . At an a_w of 0.99, the probability that a species produces measurable levels of mycotoxins is high, especially for $\Theta > 20^\circ\text{C}$. However, as previously reported for growth, *F. langsethiae* displayed a distinct behaviour compared to the other species. At a_w of 0.97, the probability of mycotoxin production by this species strongly decreased with the Θ (Figure 8). When comparing the five species at $a_w = 0.97$, it appeared that *F. poae* and *F. tricinctum* were characterized by the highest p_p .

A censored 2-way ANOVA was performed using the whole set of mycotoxin data acquired in the present study (see Supplementary Figure 5). This allowed to clearly determine differences in the effects of Θ and a_w on the production of mycotoxins by each of the studied *Fusarium* species. A_w was shown to significantly modulate the mycotoxin production, regardless of the species, while Θ had a significant impact only for *F. graminearum*, *F. langsethiae* and *F. tricinctum*. This last species was the only one affected for its mycotoxin production by the $a_w \times \Theta$ interaction (see Supplementary Figure 5, see Supplementary Table 8).

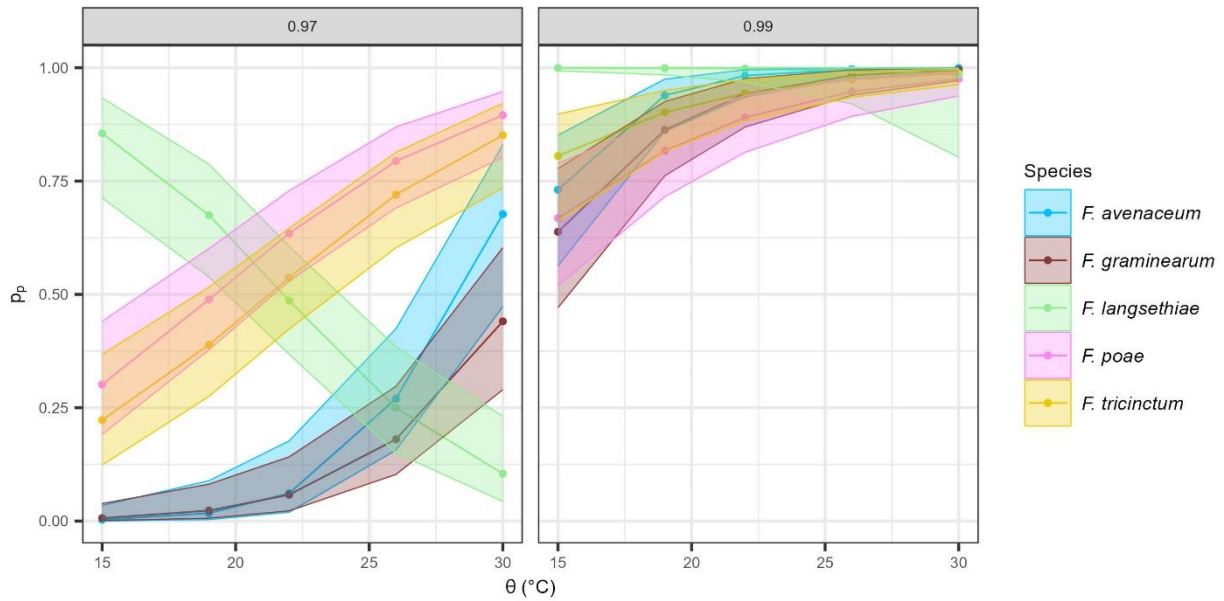


Figure 8: Probability of mycotoxin production for the five *Fusarium* species, according to environmental variation. The probability of mycotoxin production (y-axis) was estimated by the logistic regression model ($\text{logit}(p_p) = \beta_0 + (\beta_1 + \beta_{1i}) \cdot \Theta_i + \beta_{2i} \cdot a_{wi} + \beta_{12i} \cdot a_{wi} \cdot \Theta_i + \beta_{3j} \cdot fs_j + \beta_{ij} \cdot a_{wi} \cdot fs_j$) against four Θ (15, 20, 25 and 30°C, on the x-axis) and at two levels of a_w (0.97 and 0.99, in column). Each dot represents the probability of mycotoxin production of the five *Fusarium* strains for each species. Confidence intervals (95%) are represented by shading around the curves. Data for $a_w = 0.95$ are not shown because very few grown replicates were able to produce mycotoxins above the quantification threshold.

CORRELATION BETWEEN ENVIRONMENTAL CONDITIONS, MYCOTOXINS AND GROWTH PARAMETERS

Correlations between growth parameters and mycotoxin production were analysed, considering the studied environmental factors (a_w , Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$). All data (ranks of growth parameters and mycotoxin) related to each fungal species were combined in PCA analyses (Figure 9). The first axis represented 50% to 56% of the variance depending on the considered species. For *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae* and *F. tricinctum*, the first axis was shown to discriminate samples characterized by an early (τ) and high (V_{max}) growth leading to high OD at 14 days, together with high mycotoxin production levels ($\rho = 0.39$ to 0.57), from late and low growth samples, together with low mycotoxin production levels. The second axis represented 23 to 27% of the variance, leading to a negative correlation between ranks of τ and r ($\rho = -0.51$). The third axis, contributed to 6 to 15% to the variance.

This axis primarily reflected variations in mycotoxin ranks, which tended to be higher in samples grown at high a_w . The mycotoxin ranks moderately correlated with other growth parameters ($\rho = 0.31$ for K , -0.36 for τ , and 0.13 for r) and more strongly with OD at 14 days ($\rho = 0.48$). The previous observations suggest that samples characterized by a delayed growth were associated with a lower production of mycotoxins. Overall, results presented in Figure 9 clearly show that mycotoxin production is correlated to growth parameters, regardless of the species, and differentially driven by environmental factors (a_w , Θ). Finally, the growth and the mycotoxin production of *F. graminearum*, *F. avenaceum* and *F. tricinctum* were correlated and were specifically favoured by $\Theta \geq 25^\circ\text{C}$.

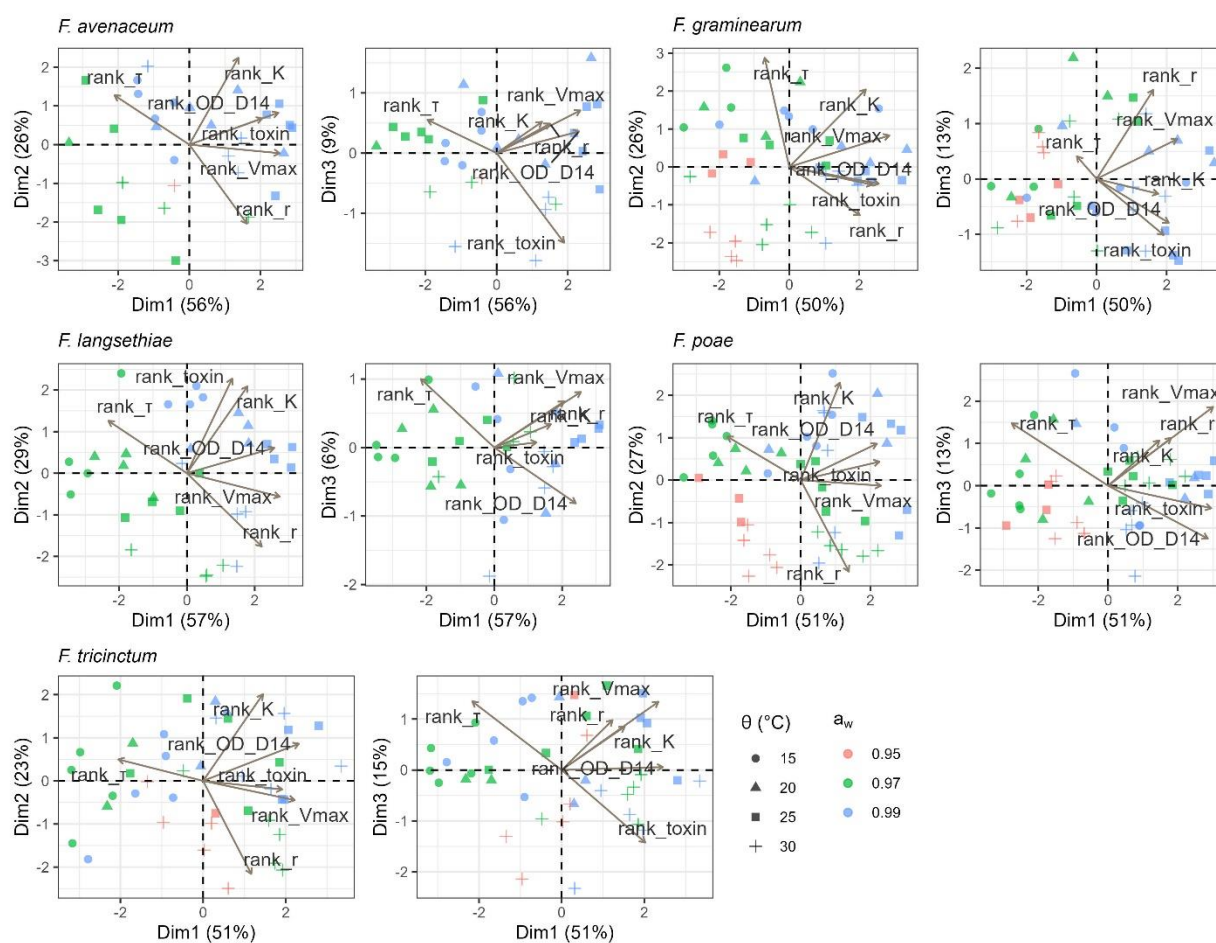


Figure 9: Principal component analysis of mycotoxin and growth parameters (τ , K , r and V_{\max}) for the five *Fusarium* species. The ranks of growth parameter and mycotoxins for *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum* are presented at four Θ (15, 20, 25 and 30°C) and three a_w levels (0.95, 0.97 and 0.99). For each species, first biplot is for (Dim1, Dim2) and second biplot is for (Dim1, Dim3). Each dot corresponds to a strain growing at specific a_w and Θ .

DISCUSSION

Fusarium Head Blight (FHB) is a multi-pathogen disease caused by a consortium of several *Fusarium* species occupying the same niche. A more comprehensive understanding of the intricacies of such multiple infections is essential to predict the outcome in terms of disease development but also mycotoxin production. Climate is certainly the first driving force that shape *Fusarium* spp. occurrence in the field (Perrone *et al.* 2020). Using *in vitro* studies, we investigated the behaviour of major *Fusarium* species under various challenging environmental conditions.

Several studies have already addressed the impact of abiotic constraints on the growth and mycotoxin production of *Fusarium* species (Medina *et al.* 2010; Peter Mshelia *et al.* 2020; Yu *et al.* 2021). But to the best of our knowledge, no comprehensive analysis as the one discussed in the present study has been published before. Indeed, this study is the first one considering five major *Fusarium* species causing FHB and a large range of combined temperature and water activity conditions. In addition, whereas most of the earlier studies have mainly focused on one or a couple of strains, the present one was based on a set of five strains per species. Lastly, the analytical process of our dataset was optimized by the use of innovative statistical approaches.

OPTIMISING ANALYSES TO FULLY EXPLOIT RELEVANT BIOLOGICAL DATA

Inferring fungal growth rates from optical density (OD) measurements has been already proven to be relevant, either for yeast-like microorganism or for filamentous fungi (Boixel *et al.* 2019; Hameed *et al.* 2024). In this paper, the OD readings were directly used as raw data, generating a large dataset that allowed robust statistical analyses for modelling growth and estimating time-course growth parameters for each *Fusarium* species. Thus, the observed growth curves were consistent with theoretical growth patterns, displaying the four expected phases; lag, exponential, deceleration and stationary (see Supplementary Figure 1), despite hyphal growth and the possible production of secondary metabolites that could affect OD measurements. The measurements were repeatable across replicates and revealed different responses to environmental conditions. Such high-throughput phenotyping experiments, with a large number of strains and replicates, rapidly become time consuming, generate a lot of waste, can be quite onerous and require an optimal valorisation of acquired data (Heidorn 2008; Zamir 2013). This optimal valorisation was a secondary objective of the present work. To achieve this

objective, appropriate statistical methods were used to ensure optimum preservation of the relevant information. For example, generalized additive models (GAM) have enabled accurate mapping of the OD of the culture medium, improving the sensitivity and specificity of fungal growth and estimated growth curves, even at very low values of OD (Wood 2017). Furthermore, instead of discarding wells lacking growth/mycotoxin production, we used logistic regression models which provided valuable insights into the intrinsic dynamics of these wells. As far as we know, this was the first time where growth and mycotoxin production were expressed as probability. Such insights are particularly relevant in the context of *Fusarium* Head Blight (FHB), where the presence or absence of species in the field carries significant implications beyond mere quantitative considerations. Moreover, in the analysis of mycotoxins, we decided to not discard values falling below detection/quantitation limits (observed in 46% of the samples) and to not substitute them with arbitrary values, a practice discouraged by Shoari and Dubé (2018) for example. By employing methods tailored to handle censored data, we were able to explore a broader spectrum of environmental conditions.

DIFFERENTIAL RESPONSES OF FUSARIUM SPECIES UNDER FLUCTUATING ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Growth and mycotoxin production responses to changing environmental conditions were shown to differ according to the studied *Fusarium* species. Our results indicated that *F. graminearum* was the most affected in its growth ability by challenging environmental conditions, suggesting that this species could display a lower phenotyping robustness than the other species. Our data agree with previous reports indicating highest growth rates at $a_w = 0.99$ and $\Theta = 25^\circ\text{C}$ for *F. graminearum* (Hope *et al.* 2005).

Consistently, the growth probability assessed for *F. graminearum* was lower than that of the other *Fusarium* species, except at 25°C . This observation could be the result of different ecophysiological requirements of *Fusarium* species particularly for growth initiation. Indeed, in the literature, 25°C is often considered to be the optimum temperature for *F. graminearum* germination (Manstretta *et al.* 2016).

We showed that *F. langsethiae* exhibited a different behaviour compared to *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* and *F. tricinctum*. Notably, the highest probabilities of growth and mycotoxin production for this species were observed at 15°C .

We have also observed that combined environmental factors, water activity (a_w) and temperature (Θ), impacted significantly both the growth dynamics and mycotoxin production, regardless of the species. Our findings showed contrasted responses of τ and K parameters,

suggesting that the growth rate is more affected by Θ , while a_w has a greater influence on final growth. Verheecke-Vaessen *et al.* (2022) observed similar results using three *F. langsethiae* strains, demonstrating that the lag phase was predominantly impacted by Θ . Additionally, the growth of *F. graminearum* and *F. culmorum* was reported as being strongly affected by Θ variations (Hope *et al.* 2005). Our data also demonstrated that mycotoxin production is strongly affected by a_w levels and Θ , which is consistent with previous studies (Kokkonen *et al.* 2010; Medina and Magan 2011). The latter authors observed a major effect of a_w on T-2 and HT-2 mycotoxin production by *F. langsethiae*. We specifically observed that the production of mycotoxins by *F. graminearum* was more restrained in challenging conditions than that of the other species, as described by Hope *et al.* (2005).

Moreover, we highlighted the correlation between growth and end-point mycotoxin production, emphasising the importance of the mycotoxin production dynamics, as described by Verheecke-Vaessen *et al.* (2022). Further analysis investigating the production of mycotoxin by *Fusarium* species for longer incubation times could allow clarifying whether low amounts of mycotoxin result from a delay in production or an inhibition induced by challenging environmental conditions (Hope *et al.* 2005).

EXPLORING INTRASPECIFIC DIVERSITY OF FUSARIUM SPECIES

An essential and thus far under-investigated aim of this study was to consider the intraspecific diversity within five major *Fusarium* species causing FHB. In less challenging growth conditions, we found that intraspecific diversity accounted for a high proportion of the variance compared to interspecific diversity. However, when environmental factors (a_w , Θ) were included in the analysis, it became clear that their combined effects were governing growth variation at the species and strain levels. This indicates that while intraspecific diversity has a significant impact on *Fusarium* species behaviours, its effect is negligible compared to abiotic factors, particularly in more challenging environments.

Besides, our findings illustrate the extent of the phenotypic responses to abiotic constraints exhibited by each species, suggesting the existence of genotypes that are likely to be better adapted. Our data corroborate previous reports indicating that *Fusarium* species and different strains within a same species exhibit varying degrees of resilience to environmental fluctuations and that such a diversity should absolutely be considered in initiatives aiming to predict the impact of abiotic factors on FHB. They support the conclusion of Ma *et al.* (2013) that has highlighted the difficulty of predicting FHB risk due to the occurrence of populations of distinct strains in the field.

BEYOND ECOPHYSIOLOGY OF FUSARIUM SPECIES: ANTICIPATE THEIR FUTURE DISTRIBUTION UNDER CLIMATE CHANGE

Climate change is expected to strongly impact the distribution of *Fusarium* species in Europe (Parikka *et al.* 2012) and could exacerbate the damages related to FHB including the contamination of grains with mycotoxins (Moretti *et al.* 2019). We confirmed that environmental conditions are likely to be the main driver of the predominance of one *Fusarium* species over the others. Interestingly, our results based on *in vitro* investigations support previous results from field surveys that have shown the occurrence of shifts in *Fusarium* species distribution. For example, Covarelli *et al.* (2015) confirmed the predominant effect of thermo-hygrometric conditions in the replacement of *F. graminearum* by *F. avenaceum* and *F. poae* between 2009 and 2010. Other studies have also shown that the occurrence of *F. graminearum* is promoted by moderately warm summers whereas dry and hot climates are more favourable to *F. poae* or *F. avenaceum* (Van Der Lee *et al.* 2015; Banik *et al.* 2018; Nogueira *et al.* 2018; Valverde-Bogantes *et al.* 2020). Predicting the distribution of FHB species and the associated mycotoxin risk is therefore essential to limit disease outbreaks and ensure feed and food safety.

Battilani *et al.* (2013) have established a mechanistic weather-driven model based on the life cycle of *Aspergillus flavus* to predict field contamination by aflatoxins. They emphasised the importance of including ecophysiological parameters of fungal species in the models. A similar conclusion was raised by Van Der Fels-Klerx *et al.* (2012) who have attempted to model climate change effects on wheat phenology and DON contamination in wheat cultivated in North West Europe by 2040. The previous authors have used various climatic and agronomic variables to calculate a principle empirical model underlying the biology of *Fusarium* infection and DON production. The present study highlighted intraspecific and interspecific ecophysiological properties of *Fusarium* species under environmental variations. These experimental data could be used as variables to calibrate the model parameters and improve the prediction of FHB risk and mycotoxin contamination.

In order to draw a comprehensive pattern of response to abiotic conditions, we investigated the ecophysiology of *Fusarium* species, one by one. Nevertheless, in the field, a cohort of *Fusarium* species co-occurs during FHB infection (Arseniuk *et al.* 1999). The composition of this *Fusarium* community changes over time and location, and depends both on environmental and agronomic factors (Karlsson *et al.* 2021), influencing the abundance of one species compared to another (Boutigny *et al.* 2019).

Furthermore, in addition to the ecophysiological characteristics of each species, their capacity to compete is also a key criterion governing their occurrence. As an example, *F. graminearum* is described as being one of the most competitive species when interacting with other *Fusarium* species on wheat spikes (Audenaert *et al.* 2013; Siou *et al.* 2015). However, our results suggest that such a dominance could be questioned under challenging conditions. It is now imperative to investigate the ecophysiology of different *Fusarium* species in interaction in order to better understand the influence of abiotic factors on the competition outcome and to construct a more accurate representation of what happens in the field.

CONCLUSIONS

The present study highlighted differences in ecophysiological properties of the main *Fusarium* species causing FHB in response to the combined effects of temperature and water activity. Considering five species and five strains per species grown under 24 different environments, acquired data have allowed delivering new and significant insights: (1) growth and mycotoxin production of *F. graminearum* and *F. avenaceum* was favoured by high temperatures and high water activity, (2) lower water activity levels were more conducive for *F. poae* and *F. tricinctum*, (3) *F. langsethiae* exhibited a specific fitness for the colder temperature (4) beyond contrasted behaviours between species, a large phenotypic diversity within species was also highlighted. While our data offer a comprehensive foundation for enhancing predictive models of FHB, further studies encompassing more intricate aspects, including fungal interactions and environmental factors influencing the entire life cycle, are essential to achieve greater precision.

MATERIALS AND METHODS

GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION

STRAIN COLLECTION

Five strains of five *Fusarium* species *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum* were used within this study (see Supplementary Table 1). These 25 strains (isolated from wheat, maize or barley grains) are registered in public biological resource centers or are available at the MycSA laboratory.

CULTURE MEDIA

All strains were inoculated in standardized sucrose synthetic liquid medium (MS) containing 20 g.L⁻¹ of sucrose, 0.5 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.6 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.017 g.L⁻¹

MgSO₄, 1 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, and 0.1 mL.L⁻¹ Vogel mineral salts solution. Glycerol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) was added to liquid medium according to the Norrish equation to adjust the aw values between 0.94 and 0.99. The resulting aw was controlled using an Aw-meter (TESTO 650, Lenzkirch, Germany). A total of 24 conditions of incubation were considered: temperatures (Θ) 15, 20, 25 and 30°C combined to aw = 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99.

SPORE PRODUCTION

Fungal strains were grown on Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, Le-Pont-de-Claix, France) solid medium for seven days. For each strain, the spore solution was prepared by inoculating seven agar plugs in 75 mL of carboxymethylcellulose (CMC, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) liquid medium. The cultures were incubated three days in the dark with shaking (180 rpm) at 25°C before being filtered (40 μm filter) and centrifuged at 4800g for 20 minutes. The supernatants were discarded and the spore pellets were resuspended in 4 mL of MS. The spores were counted on a Malassez cell and diluted to reach a final concentration of 1,33.106 spores.mL⁻¹. Batches of spores were kept in 50% glycerol (50:50, v/v : glycerol:MS medium) at -80°C until inoculation.

INOCULATION AND STUDY OF FUNGAL GROWTH

Batches of spores were thawed the day of inoculation. Each strain was inoculated in six replicates at a final concentration of 1,66.104 spores.mL⁻¹ in 200 μL of MS liquid medium in 96-well plates. Half of the wells of each plate were filled with blanks (non-inoculated wells, with MS at the correct aw) to avoid contamination between the wells and to allow data to be corrected from background between experiments if necessary (see “Estimation of the absorption of the plates” section). Plates were sealed with Breath-easy sealing membrane (Diversified Biotech, Boston) to avoid evaporation and incubated in the dark at the selected Θ. Optical density (OD) was measured in each well every 24 hours, five time points, at five different spatial positions in each well, using a spectrophotometer Infinite M200 pro (Tecan, Grödig, Austria) set at λ = 630 nm until the growth stationary phase was observed.

STUDY OF MYCOTOXIN PRODUCTION

The same inoculation procedure as described in the previous section was used with the following modifications: 24-well plates were used with a final volume of 2 mL of MS and

six wells per plate were used as controls (non-inoculated wells, with MS at the correct aw). Twelve conditions of incubation were performed : 15, 20, 25 and 30°C combined to aw = 0.95, 0.97 and 0.99. At the end-point time, i.e. after 14 days of incubation, the cultures were centrifuged (20 minutes at 4800g, ambient temperature). Supernatants were kept at -20°C until mycotoxin extraction and the mycelia were rinsed with water, conserved at -80°C before freeze-drying. Mycotoxins were extracted using 3 mL of ethyl acetate as extraction solvent. Briefly, the samples were shaken for 5 minutes and centrifuged 10 minutes at 4800g (ambient temperature). Upper phase was recovered and evaporated with a SpeedVac Concentrator SPD210 (Asheville, USA) at 55°C. Then, 200 µL of methanol/water (50:50, v/v) were added, and after homogenization with a Vortex mixer, extracts were filtered through a filter syringe (Acrodisc 13 mm mini spike with 0.2 µm wwPTFE; VWR International, Puerto Rico) and kept at -20°C until analysis.

MYCOTOXINS ANALYSIS

A Vanquish UHPLC (ThermoScientific, Bremen, Germany) system was used to separate mycotoxins (Type B and A trichothecenes and Enniatins) on a reversed-phase column Thermo Accucore aQ C18 (2.1 x 100 mm, 2.6 µm; ThermoScientific, Lithuania) maintained at 40°C. Mobile phase consisted of water/methanol (98:2, v/v) (eluent A) and methanol/water (98:2, v/v) (eluent B) both containing 5 mM of ammonium acetate and 0.1% (v:v) acetic acid. Gradient elution was as follows: 2% of B for 0.5 min, 2 to 98% B in 4.5 min, 98% B for 4.7 min, 98 to 2% for 0.1 min and 2% B for 2.2 min. The flow was kept at 0.4 mL.min⁻¹ and the injection volume was 2 µL. Mycotoxins were detected using a Q Exactive Focus mass spectrometer (ThermoScientific, Bremen, Germany). Heated electrospray ionization source was operated in positive mode. Full scan spectra were acquired at a 70k resolving power in the 150-1000 m/z range. The Orbitrap analyzer was m/z-calibrated each week. Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas. The main MS parameters were set as follows: sheath gas flow rate, 50 psi; auxiliary gas flow rate, 13 a.u.; sweep gas flow rate, 0 a.u.; spray voltage, 3.5 kV; capillary temperature, 320°C; S lens RF level 50%; auxiliary gas heater temperature, 350°C. External calibration was performed at 5, 10, 25, 50, 100, 250, 400 and 500 µg.L⁻¹ to quantify TCTB (Deoxynivalenol (DON), 3- and 15-ADON as 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), Zearalenone (ZEA), Nivalenol (NIV) and Fusarenon-X (FX)), TCTA (Diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 and HT-2), enniatins (ENNA, A1, B and B1) and beauvericin (BEA). Mix standard of TCTB, TCTA and ZEA in acetonitrile (10 µg.mL⁻¹) was purchased from Romer labs (Tulin, Austria) and

mix of ENN (A, A1, B, B1) and BEA in methanol (10 µg.mL⁻¹) from LIBIOS (Vindry-sur-Turdine, France).

Some mycotoxins were not detected (concentration below limit of detection (DL)), others were detected but not quantified (concentration below the lower limit of quantitation (QL)).

The limit of quantification (QL) was estimated at 5 µg.L⁻¹ for ENN quantification and at 25 µg.L⁻¹ for TCTB and TCTA.

Mycotoxin production was calculated by the sum of the different compounds within each group: TCTB (DON + 15-ADON), ENN (ENNA + ENNA1 + ENNB + ENNB1) and TCTA (DAS + T-2 + HT-2) and expressed as final concentration in µg.mL⁻¹.

DATA ANALYSIS

All statistical analyses were performed with R Studio software version 4.3.1 (2023-06-16).

ESTIMATION OF THE ABSORPTION OF THE PLATES

To avoid potential biases due to the light absorption by plates and to liquid media interference, 48 non-inoculated wells by plate (MS at the correct a_w) were used to assess and model in both spatially and temporally terms, the blank absorption. At each time point (every 24 hours), a spatial Generalized Additive Model (GAM) was applied using the *mgcv* package (Wood 2017) to interpolate the optical density (OD) values across the entire plate. GAM uses splines, which are smooth functions composed of piecewise polynomials, to relate the X and Y positions of each well to the OD values. GAM was chosen for its flexibility, smoothness, and anisotropic nature (ability to vary in different directions, see Supplementary Figure 1). After estimation, the GAM-predicted OD values attributed to the microplates (OD_{well}) were subtracted from the measured OD values in each inoculated well, yielding:

$$\Delta OD = OD_{measured} - OD_{well}.$$

FITTING OF THE GROWTH CURVES

For each well, ΔOD was fitted for each day (D) using a sigmoidal growth curve, following the equation reported below:

$$\Delta OD = \alpha + \frac{K}{1 + e^{-r(\tau-D)}}$$

α is a parameter describing the well-specific noise of the measurements due to medium absorption and has no biological meaning, while K, r and τ are parameters characterising the kinetics of ΔOD influenced by the combination of Θ and a_w . K represents the carriage

coefficient of the environment and it is expressed without unit, r is the relative growth rate in $\text{OD}_{\text{unit}} \cdot \text{days}^{-1}$ and τ is the time of the inflection point of the curve expressed in days (see Supplementary Figure 2). The growth rate at inflexion time (V_{max} expressed in $\text{OD}_{\text{unit}} \cdot \text{days}^{-1}$) is obtained as $rK/4$. We then employed the *drm* function from the *drc* package to fine-tune the curves (Ritz *et al.* 2015).

MODELLING THE PROBABILITY OF GROWTH

Depending on the experimental conditions, some strains did not grow at all in some replicates, while the other replicates showed measurable growth. Growth probability was first approximated for each species by calculating the growth frequency (f_g , Figure 1) of the six replicates for each strain. The probability of growth (p_g , Figure 2) was then modelled, using a logistic regression.

The logistic regression method assumes a linear relation between the logit of the growth probability (p_g) and the covariates; temperature (Θ), water activity (a_w), and *Fusarium* species (fs):

$$\text{logit}(p_g) = \log(p_g/(1-p_g)) = \beta_0 + (\beta_1 + \beta_{1i}) \cdot \Theta_i + (\beta_2 + \beta_{2i}) \cdot a_{wi} + \beta_{12} \cdot a_{wi} \cdot \Theta_i + \beta_{3i} \cdot fs_i$$

where β_1 and β_2 correspond to the effect of Θ and a_w , respectively; β_{3i} corresponds to the effect of *Fusarium* species i ; β_{1i} (and β_{2i}) corresponds to the interaction between *Fusarium* species and Θ (respectively a_w); and β_{12} represents the interaction between Θ and a_w .

The optimal model was selected among all possible combinations of covariates using the Bayesian Information Criterion (BIC). The logistic regression method is valuable as it offers an analytical approach to model the growth probability. The *glm* function base was used to adjust the logistic regression model.

VARIANCE PARTITIONING ANALYSIS

To investigate the influence of each factor on each parameter (K , r , τ and V_{max}), a type-III ANOVA, incorporating Θ , a_w , *Fusarium* species, and their respective interactions as covariates was applied. The strain was nested within the *Fusarium* species factor. The results of the ANOVA analysis were used to decompose the variance explained by each of the factors and their interactions. This analysis was done using the *ANOVA* function, together with the *lmer* function of the *nlme* package.

The proportions of variance explained by the species and the strain for each parameter, at each level of Θ and a_w , were compared, using the *partvar* function of the *cati* package (Taudiere and

Violle 2016). Effect of the intraspecific diversity was investigated by running an ANOVA within each species on each parameter, with Θ and a_w as covariates.

MODELLING THE PROBABILITY OF MYCOTOXIN PRODUCTION

Mycotoxin production was not dynamically measured since the procedure used in the present study was destructive (refer to the section “Study of mycotoxin production”).

Depending on experimental conditions, some species/strains/replicates were shown to produce quantifiable amounts of mycotoxins while others did not. Similarly as what was done for growth probability, logistic regressions were applied to model the probability of mycotoxin production. The logistic regression method assumes a linear correlation between the logit of the mycotoxin production probability (p_p) and the covariates; temperature (Θ), water activity (a_w), and *Fusarium* species (fs). The optimal model was selected among all possible combinations of covariates using the BIC.

$$\text{logit}(p_p) = \log(p_p/(1-p_p)) = \beta_0 + (\beta_1 + \beta_{1i}) \cdot \Theta_i + \beta_{2i} \cdot a_{wi} + \beta_{12i} \cdot a_{wi} \cdot \Theta_i + \beta_{3j} \cdot fs_j + \beta_{ij} \cdot a_{wi} \cdot fs_j$$

where β_1 corresponds to the effect of Θ , β_{1i} (and β_{2i}) corresponds to the interaction between species and Θ (respectively a_w), β_{12i} represents the interaction between Θ and a_w , β_{3j} corresponds to the effect of *Fusarium* species j , and β_{ij} corresponds to the interactions between a_w and the *Fusarium* species j .

However, for *F. langsethiae*, numerical issues were faced since the a_w factor induced a separation problem (when a covariate completely explains an outcome; Albert and Anderson 1984) where all samples exhibited growth at $a_w = 0.99$. This separation led to huge confidence intervals and infinite parameters in logistic regression. To overcome this issue, the method proposed by Heinze and Schemper (2002) was applied. Briefly, this method aims to maximize a penalised likelihood to get a finite estimate of the parameters. It is available in the *logistf* package.

EFFECT OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON THE MYCOTOXIN PRODUCTION

In some grown replicates, mycotoxin levels were below the QL (left-censored observations). Common practices for handling left-censored observations involve either discarding values below the quantitation limit or substituting them with an arbitrary value (*i.e.* half of the quantitation threshold). However, these approaches may i) discard valuable information from the original data and/or ii) introduce biases in summary statistical calculations (Shoari *et al.* 2016; Shoari and Dubé 2018).

Therefore, for each species and associated mycotoxin group, a censored version of a two-way ANOVA was done. This version of the ANOVA allows to test differences between groups on a quantitative variable, while retaining left-censored observations. The effect of Θ , a_w and their interaction was tested and the model having the best BIC was selected. The function from the *NADA2* package (v1.1.; Julian and Helsel 2024) was used.

CORRELATIONS BETWEEN MYCOTOXINS PRODUCTION AND GROWTH PARAMETERS

The correlation between mycotoxin production and growth parameters was investigated using a Principal Component Analysis (PCA) on the ranks of both growth parameters and mycotoxins quantification, for each species and strain. To mitigate scale effects resulting from the different mycotoxins, the ranks of mycotoxins (*i.e.* ordered mycotoxins based on their values relative to the dataset) were computed within each group of mycotoxins (TCTB, TCTA and ENNs). To take into account the fact that under challenging growth conditions, some samples did not finish their growth at 14 days, the OD at 14 days was included in the analysis when mycotoxins were measured. PCA on the ranks allowed to keep many values without introducing biases caused by arbitrary data substitution.

FUNDING

This study was supported by the French National Research Agency (EvoITox project, grant ANR-20-CE32-0011-01) and the IdEX Bordeaux University “Investments for the Future” program GPR Bordeaux Plant Sciences.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sylvain Chéreau for the initial development of the LC-MS method. We also thank Maider Abadie for her English supervision.

DATA AVAILABILITY

Data and scripts are available in the data INRAE repository:

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Albert A and Anderson JA. On the existence of maximum likelihood estimates in logistic regression models. *Biometrika* 1984;**71**:1–10. DOI: 10.1093/biomet/71.1.1
- Arseniuk E, Foremska E, G T *et al.* *Fusarium* Head Blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology* 1999;**147**:577–90. DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.00433.x
- Audenaert K, Vanheule A, Höfte M *et al.* Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins* 2013;**6**:1–19. DOI: 10.3390/toxins6010001
- Banik M, Beyene M and Wang X. *Fusarium* Head Blight of Barley in Manitoba. 2018.
- Battilani P, Camardo Leggieri M, Rossi V *et al.* AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture* 2013;**94**:38–46. DOI: 10.1016/j.compag.2013.03.005
- Beccari G, Colasante V, Tini F *et al.* Causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat (*Triticum durum* desf.) in central Italy and their in vitro biosynthesis of secondary metabolites. *Food Microbiology* 2018;**70**:17–27. DOI: 10.1016/j.fm.2017.08.016
- Beyer M, Pogoda F, Pallez M *et al.* Evidence for a reversible drought induced shift in the species composition of mycotoxin producing *Fusarium* head blight pathogens isolated from symptomatic wheat heads. *International Journal of Food Microbiology* 2014;**182–183**:51–6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.002
- Boixel A-L, Delestre G, Legeay J *et al.* Phenotyping thermal responses of yeasts and yeast-like microorganisms at the individual and population levels: proof-of-concept, development and application of an experimental framework to a plant pathogen. *Microb Ecol* 2019;**78**:42–56. DOI: 10.1007/s00248-018-1253-6
- Boutigny A-L, Gautier A, Basler R *et al.* Metabarcoding targeting the EF1 alpha region to assess *Fusarium* diversity on cereals. *PLoS ONE* 2019;**14**:e0207988. DOI: 10.1371/journal.pone.0207988

- Covarelli L, Beccari G, Prodi A *et al.* *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *J Sci Food Agric* 2015;**95**:540–51. DOI: 10.1002/jsfa.6772
- Cundliffe E and Davies JE. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977;**11**:491–9. DOI: 10.1128/AAC.11.3.491
- Cundliffe E, Cannon M and Davies JE. Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974;**71**:30–4. DOI: 10.1073/pnas.71.1.30
- Dinolfo MI and Stenglein S. *Fusarium poae* and mycotoxins: potential risk for consumers. *Bol Soc Argent Bot* 2014;**49**:5–20.
- Dubois C and Roucou A. L'environnement agroclimatique agit sur l'équilibre de deux espèces. *Perspectives Agricoles* 2023.
- Eudes F, Comeau A, Rioux S *et al.* Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with the fusariosis of wheat spikelets. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2000;**22**:286–92. DOI: 10.1080/07060660009500477
- Fink-Gremmels J and Malekinejad H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 2007;**137**:326–41. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.008
- Fox EM and Howlett BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 2008;**11**:481–7. DOI: 10.1016/j.mib.2008.10.007
- Garcia-Cela E, Verheecke-Vaessen C, Magan N *et al.* The ``-omics'' contributions to the understanding of mycotoxin production under diverse environmental conditions. *Current Opinion in Food Science* 2018;**23**:97–104. DOI: 10.1016/j.cofs.2018.08.005
- Gautier C, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F. *Fusarium* mycotoxins Enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests. *J Agric Food Chem* 2020;**68**:4788–98. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c00411

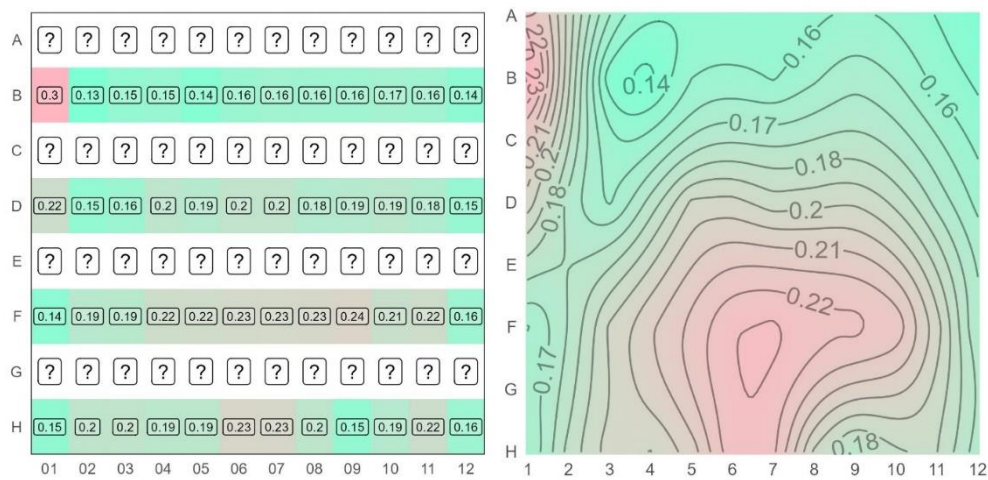
- Hameed T, Motsi N, Bignell E *et al.* Inferring fungal growth rates from optical density data. *PLoS Comput Biol* 2024;**20**:e1012105. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1012105
- Heidorn PB. Shedding light on the dark data in the long tail of science. *lib* 2008;**57**:280–99. DOI: 10.1353/lib.0.0036
- Heinze G and Schemper M. A solution to the problem of separation in logistic regression. *Statist Med* 2002;**21**:2409–19. DOI: 10.1002/sim.1047
- Hope R, Aldred D and Magan N. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Lett Appl Microbiol* 2005;**40**:295–300. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01674.x
- Infantino A, Belocchi A, Quaranta F *et al.* Effects of climate change on the distribution of *Fusarium* spp. in Italy. *Science of The Total Environment* 2023;**882**:163640. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163640
- Julian P and Helsel D. NADA2: data analysis for censored environmental data. 2024:1.1.6. DOI: 10.32614/CRAN.package.NADA2
- Karlsson I, Persson P, Friberg H. *Fusarium* Head Blight from a microbiome perspective. *Front Microbiol* 2021;**12**:628373. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628373
- Knutsen HK, Alexander J, Barregård L *et al.* Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal* 2017;**15**, DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4718.
- Kokkonen M, Medina A and Magan N. Comparative study of water and temperature relations of growth and T-2/HT-2 toxin production by strains of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *World Mycotoxin Journal* 2012;**5**:365–72. DOI: 10.3920/WMJ2012.1406
- Kokkonen M, Ojala L, Parikka P *et al.* Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 2010;**143**:17–25. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.015
- Kos J, Anić M, Radić B *et al.* Climate change—A global threat resulting in increasing mycotoxin occurrence. *Foods* 2023; 12(14):2704. DOI: 10.3390/foods12142704

- Langseth W, Bernhoft A, Rundberget T *et al.* Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 1999;**144**:103–13. DOI: 10.1023/A:1007016820879
- Ma L-J, Geiser DM, Proctor RH *et al.* *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol* 2013;**67**:399–416. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155650
- Mallebrera B, Prosperini A, Font G *et al.* In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity: A review. *Food and Chemical Toxicology* 2018;**111**:537–45. DOI: 10.1016/j.fct.2017.11.019
- Manstretta V, Morcia C, Terzi V *et al.* Germination of *Fusarium graminearum* ascospores and wheat infection are affected by dry periods and by temperature and humidity during dry periods. *APS* 2016;**106**:262–9. DOI: 10.1094/PHYTO-05-15-0118-R
- Medina A, Magan N. Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology* 2010;**142**:365–9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.021
- Medina A, Magan N. Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology* 2011;**28**:392–8. DOI: 10.1016/j.fm.2010.09.012
- Moretti A, Pascale M, Logrieco AF. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology* 2019;**84**:38–40. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.03.008
- Nazari L, Patteri E, Terzi V *et al.* Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology* 2014;**39**:19–26. DOI: 10.1016/j.fm.2013.10.009
- Nogueira M, Decundo J, Martinez M *et al.* Natural Contamination with Mycotoxins Produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in Malting Barley in Argentina. *Toxins* 2018;**10**:78. DOI: 10.3390/toxins10020078
- Osborne LE and Stein JM. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 2007;**119**:103–8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032

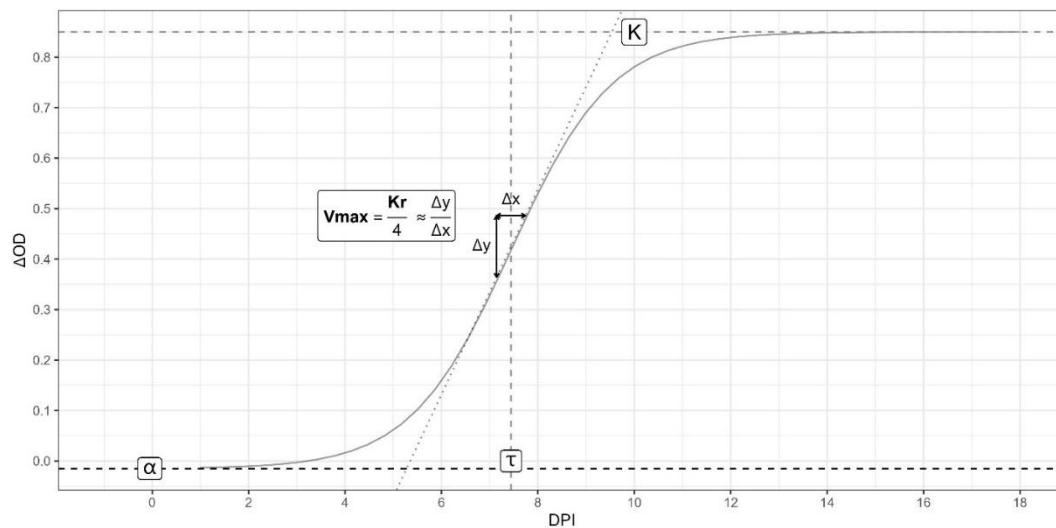
- Parikka P, Hakala K, Tiilikkala K. Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012;**29**:1543–55. DOI: 10.1080/19440049.2012.680613
- Perrone G, Ferrara M, Medina A *et al.* Toxigenic fungi and mycotoxins in a climate change scenario: ecology, genomics, distribution, prediction and prevention of the risk. *Microorganisms* 2020;**8**:1496. DOI: 10.3390/microorganisms8101496
- Peter Mshelia L, Selamat J, Iskandar Putra Samsudin N *et al.* Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins* 2020;**12**:478. DOI: 10.3390/toxins12080478
- Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C *et al.* Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal byproducts. *Toxins* 2016;**8**:45. DOI: 10.3390/toxins8020045
- Ritz C, Baty F, Streibig JC *et al.* Dose-response analysis using R. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0146021. DOI: 10.1371/journal.pone.0146021
- Shoari N and Dubé J. Toward improved analysis of concentration data: embracing nondetects. *Enviro Toxic and Chemistry* 2018;**37**:643–56. DOI: 10.1002/etc.4046
- Shoari N, Dubé J-S and Chenouri S. On the use of the substitution method in left-censored environmental data. *Human and Ecological Risk Assessment* 2016;**22**:435–46. DOI: 10.1080/10807039.2015.1079481
- Siou D, Gélisse S, Laval V *et al.* Interactions between Head Blight pathogens: consequences for disease development and toxin production in wheat spikes. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**:957–65. DOI: 10.1128/AEM.02879-14
- Steinmetz WE, Rodarte CB and Lin A. 3D QSAR study of the toxicity of trichothecene mycotoxins. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009;**44**:4485–9. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.06.012
- Taudiere A and Violle C. cati: an R package using functional traits to detect and quantify multi-level community assembly processes. *Ecography* 2016;**39**:699–708. DOI: 10.1111/ecog.01433

- Ueno Y and Matsumoto H. Inactivation of some thiol-enzymes by trichothecene mycotoxins from *Fusarium* species. *Chem Pharm Bull* 1975;**23**:2439–42. DOI: 10.1248/cpb.23.2439
- Valverde-Bogantes E, Bianchini A, Herr JR *et al.* Recent population changes of *Fusarium* head blight pathogens: drivers and implications. *Can J Plant Pathol* 2020;**42**:315–29. DOI: 10.1080/07060661.2019.1680442
- Van Der Fels-Klerx HJ, Olesen JE, Madsen MS *et al.* Climate change increases deoxynivalenol contamination of wheat in north-western Europe. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012;**29**:1593–604. DOI: 10.1080/19440049.2012.691555
- Van Der Lee T, Zhang H, Van Diepeningen A *et al.* Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2015;**32**:453–60. DOI: 10.1080/19440049.2014.984244
- Verheecke-Vaessen C, Lopez-Pietro A, Garcia-Cela E *et al.* Intra-species variability in *Fusarium langsethiae* strains in growth and T-2/HT-2 mycotoxin production in response to climate change abiotic factors. *WMJ* 2022;**15**:27–34. DOI: 10.3920/WMJ2020.2584
- Vogelgsang S, Beyer M, Pasquali M *et al.* An eight-year survey of wheat shows distinctive effects of cropping factors on different *Fusarium* species and associated mycotoxins. *European Journal of Agronomy* 2019;**105**:62–77. DOI: 10.1016/j.eja.2019.01.002
- Wood SN. Generalized Additive Models: An Introduction with R SECOND EDITION. *CRC Press* 2017.
- Xu X-M, Parry DW, Nicholson P *et al.* Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *Eur J Plant Pathol* 2005;**112**:143–54. DOI: 10.1007/s10658-005-2446-7
- Yu S, Jia B, Li K *et al.* Pre-warning of abiotic factors in maize required for potential contamination of *Fusarium* mycotoxins via response surface analysis. *Food Control* 2021;**121**:107570. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107570
- Zamir D. Where have all the crop phenotypes gone? *PLoS Biol* 2013;**11**:e1001595. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001595

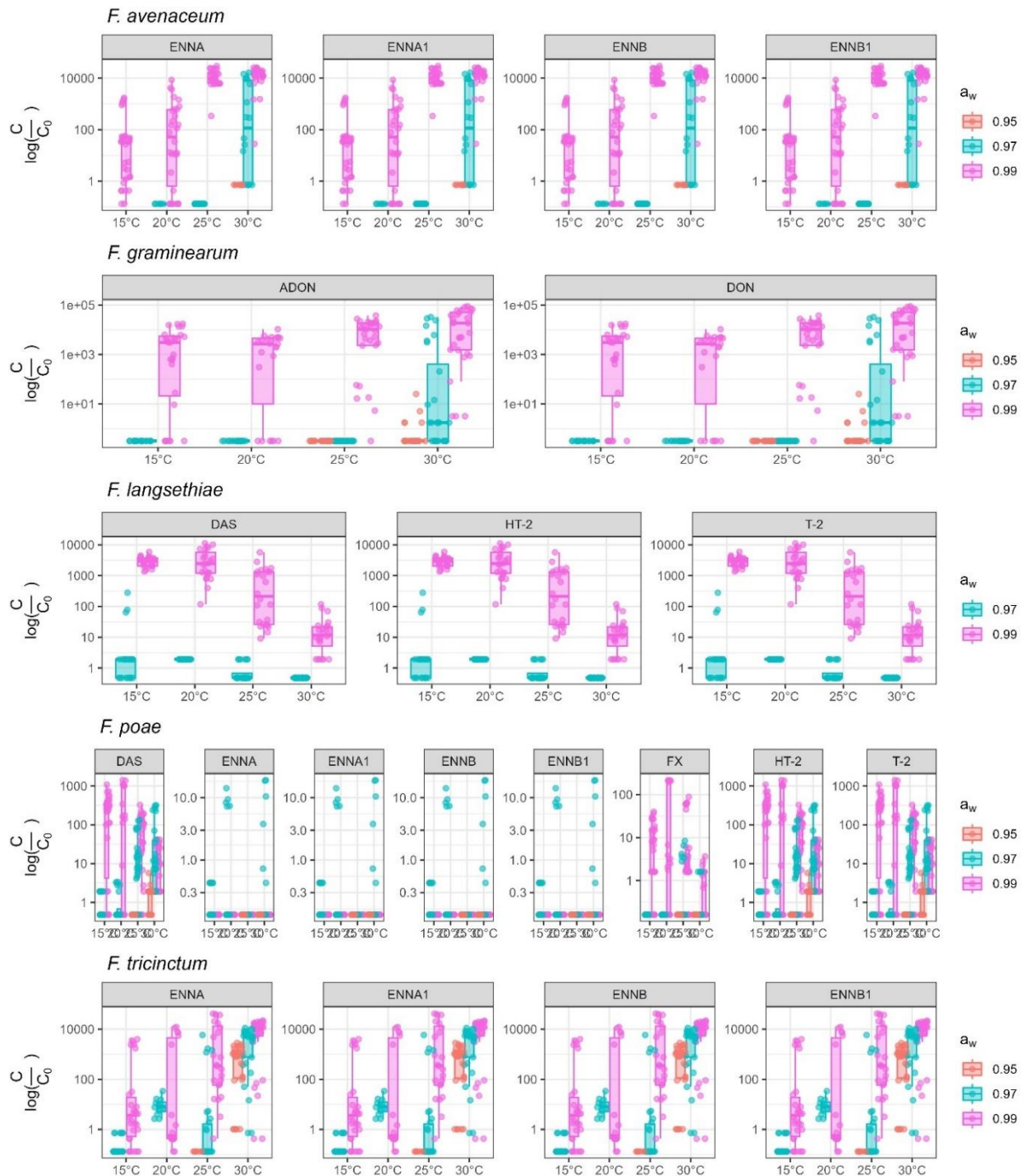
SUPPLEMENTARY FILES



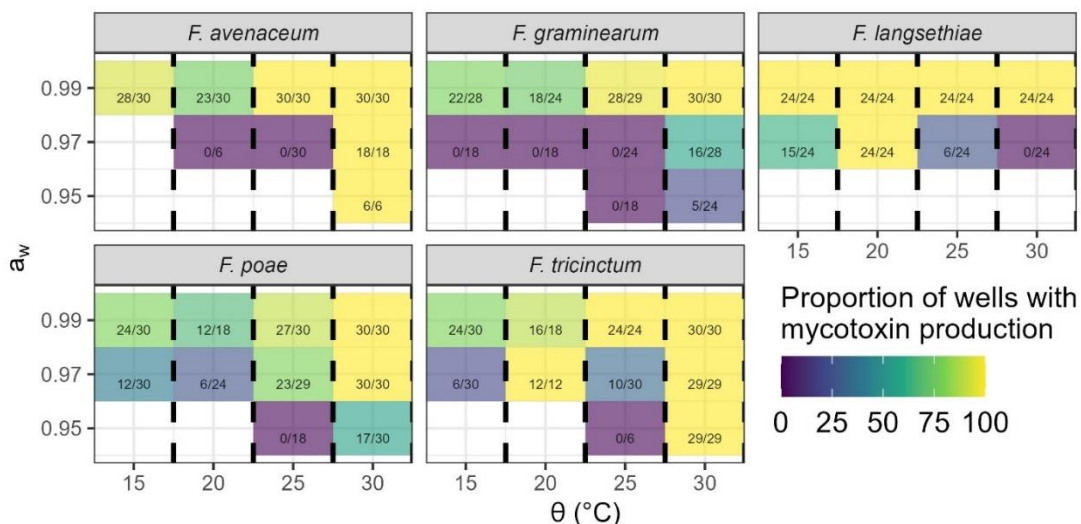
Supplementary Figure 1: Spatial distribution of plate and medium absorbance at $\lambda = 630\text{nm}$. Fungal replicates were inoculated on lines A, C, E and G and blanks (MS at the correct a_w) were placed in lines B, D, F and H of each plate (left part of the Figure). Growth measurements were done on inoculated wells (indicated by ? symbol) and on non-inoculated wells (example of values in lines B, D, F and H). Blank absorption was modelled for each plate (right part of the Figure), using a spatial Generalised Additive Model (GAM) to interpolate the optical density (OD) values across the entire plate.



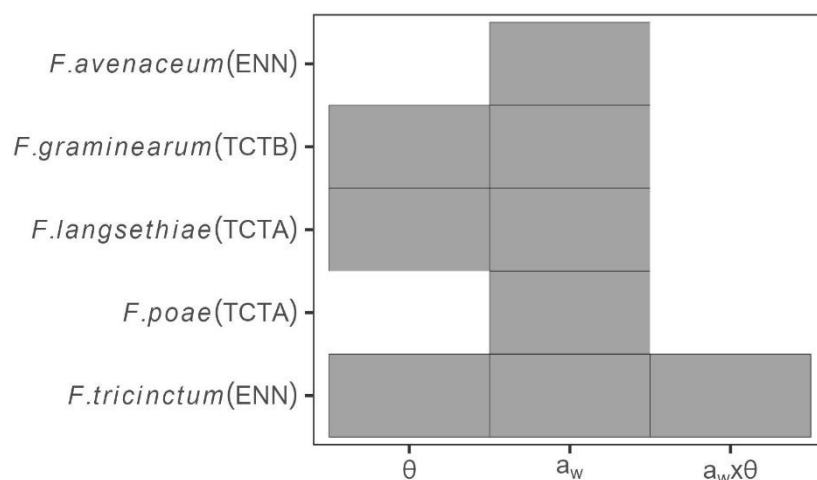
Supplementary Figure 2: Graphical significance of growth parameters (τ , K , r and V_{max}). Growth parameters were estimated from fungal growth curves for six replicates of the five *Fusarium* species at four Θ (15, 20, 25 and 30°C) and six a_w (0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99).



Supplementary Figure 3 : Details of mycotoxin produced by the five *Fusarium* species under environmental variation. Mycotoxins produced (log-transformed, y-axis) by *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum* at four Θ (15, 20, 25 and 30°C, x-axis) and three a_w levels (0.95, 0.97 and 0.99). Each dot represents one replicate and the boxplots show the intraspecific diversity in terms of mycotoxin production within each *Fusarium* species.



Supplementary Figure 4 : Frequency of mycotoxin production for the five *Fusarium* species depending on environmental variation. The number of replicates in which mycotoxins were detected is represented on the total number of grown replicates for *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinatum* for four Θ (15, 20, 25 and 30°C, x-axis) and three a_w levels (0.95, 0.97 and 0.99, y-axis). Replicates that did not grow are not shown.



Supplementary Figure 5 : Effects of environmental factors (a_w and Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$) on mycotoxin production for the five *Fusarium* species. Grey tiles indicate the significant effect (retained in the model with the best Bayesian Information Criterion) of environmental factors (a_w and Θ) and their interaction (x -axis) on mycotoxins produced by *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinatum* (y-axis).

Supplementary Table 1. Strain metadata. Five strains of five different *Fusarium* species were analysed. Their identification name in the INRAE collection (Strain), the supplier, their location (Origin), the plant host and the year of isolation are reported.

Species	Strain	Supplier	Origin	Host	Year
<i>F. graminearum</i>	I156	MycSA	France - 18	Bread wheat	2001
	I159	MycSA	France - 18	Bread wheat	2001
	I164	MycSA	France - 76	Bread wheat	2002
	I178	MycSA	France - 27	Bread wheat	2002
	I181	MycSA	France - 27	Bread wheat	2002
<i>F. avenaceum</i>	I873	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH27)	Canada	Wheat	2011
	I498	Bayer	NA	Wheat	2007
	I874	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH03)	Canada	Wheat	2011
	I612	GEVES 01.01.09.06	Scotland	Wheat	2010
	I495	Bayer	France - 86	Wheat	2007
<i>F. poae</i>	I72	2253	France - 26	Bread wheat	NA
	I474	NA	France - 28	Wheat	2007
	I491	NA	France - 86	Wheat	2007
	I488	NA	NA	Wheat	2007
	I484	NA	France - 59	Wheat	2007
<i>F. langsethiae</i>	I509	NA	France - 28	Wheat	2007
	I508	NA	France - 28	Wheat	2007
	I500	NA	France - 02	Wheat	2007
	I502	NA	France - 59	Wheat	2007
	I466	IFBM E4880715	NA	NA	NA
<i>F. tricinctum</i>	I104	2298	France - 45	Maize	2001
	I106	2488	France - 45	Maize	2001
	I524	NA	NA	Wheat	2007

	I526	NA	NA	Wheat	2007
	I86 MUCL 18522	NA	Europe, Belgium, Wallonie, Brabant Wallon, Nil-Saint- Vincent	Barley	1972

Supplementary Table 2 - ANOVA results of interspecific diversity of the growth parameters (τ , K , r and V_{max}). The value of Fisher's coefficient (F), the *p*-value (Pr(>F)) and the proportion of variance explained (% Var) by the effect of species, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions ($a_w \times \Theta$, Species $\times a_w$ and Species $\times \Theta$) are reported for each growth parameters. Pr(>F) highlighted in bold indicates the significance of the Fisher test.

Factor	τ			K			r			Vmax		
	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var
Species	1.14	0.34	0.53	3.79	0.01	4.24	1.57	0.19	1.46	0.47	0.75	0.84
a_w	24.02	0.00	11.22	35.80	0.00	40.03	6.69	0.00	6.25	5.34	0.00	9.46
Θ	85.84	0.00	40.10	1.34	0.27	1.50	27.62	0.00	25.78	2.97	0.04	5.26
$a_w \times \Theta$	73.94	0.00	34.54	22.06	0.00	24.66	8.13	0.00	7.59	26.09	0.00	46.25
Species $\times a_w$	3.16	0.00	1.47	3.32	0.00	3.72	2.18	0.01	2.04	3.22	0.00	5.70
Species $\times \Theta$	2.46	0.01	1.15	2.50	0.01	2.80	4.95	0.00	4.62	3.18	0.00	5.63
Residual			10.98			23.06			52.26			26.85

Supplementary Table 3 - ANOVA results of the *F. avenaceum* growth parameters (τ , K , r and V_{max}). The value of Fisher's coefficient (F), the *p*-value (Pr(>F)) and the proportion of variance explained (% Var) by the effect of strain, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions ($a_w \times \Theta$, Strain $\times a_w$ and Strain $\times \Theta$) are reported for each growth parameters of *F. avenaceum*. Pr(>F) highlighted in bold indicates the significance of the Fisher test.

Factor	τ			K			r			Vmax		
	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var
Strain	8.80	0.00	1.36	2.13	0.08	0.31	1.34	0.25	1.71	3.50	0.01	1.71
a_w	45.97	0.00	7.13	620.43	0.00	89.20	22.04	0.00	28.16	100.91	0.00	49.22
Θ	536.94	0.00	83.24	20.56	0.00	2.96	41.70	0.00	53.27	64.96	0.00	31.69
$a_w \times \Theta$	22.91	0.00	3.55	24.83	0.00	3.57	4.79	0.00	6.12	20.85	0.00	10.17
Strain $\times a_w$	15.67	0.00	2.43	11.68	0.00	1.68	6.20	0.00	7.92	7.44	0.00	3.63
Strain $\times \Theta$	13.73	0.00	2.13	14.90	0.00	2.14	1.21	0.27	1.55	6.35	0.00	3.10
Residual			0.16			0.14			1.28			0.49

Supplementary Table 4 - ANOVA results of the *F. graminearum* growth parameters (τ , K , r and V_{max}). The value of Fisher's coefficient (F), the *p*-value (Pr(>F)) and the proportion of variance explained (% Var) by the effect of strain, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions ($a_w \times \Theta$, Strain $\times a_w$ and Strain $\times \Theta$) are reported for each growth parameters of *F. graminearum*. Pr(>F) highlighted in bold indicates the significance of the Fisher test.

Factor	τ			K			r			Vmax		
	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var
Strain	26.68	0.00	1.66	37.02	0.00	15.84	3.91	0.00	10.03	49.58	0.00	24.55
a_w	242.42	0.00	15.09	111.42	0.00	47.68	2.44	0.05	6.25	77.99	0.00	38.63
Θ	1,255.53	0.00	78.13	65.66	0.00	28.10	17.59	0.00	45.11	41.17	0.00	20.39
$a_w \times \Theta$	75.80	0.00	4.72	5.67	0.00	2.43	2.17	0.01	5.56	4.44	0.00	2.20
Strain $\times a_w$	2.17	0.01	0.13	3.48	0.00	1.49	7.36	0.00	18.88	10.73	0.00	5.31
Strain $\times \Theta$	3.29	0.00	0.20	9.42	0.00	4.03	4.52	0.00	11.59	16.99	0.00	8.42
Residual			0.06			0.43			2.56			0.50

Supplementary Table 5 -ANOVA results of the *F. langsethiae* growth parameter (τ , K, r and Vmax). The value of Fisher's coefficient (F), the *p-value* (Pr(>F)) and the proportion of variance explained (% Var) by the effect of strain, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions ($a_w \times \Theta$, Strain $\times a_w$ and Strain $\times \Theta$) are reported for each growth parameters of *F. langsethiae*. Pr(>F) highlighted in bold indicates the significance of the Fisher test.

	τ			K			r			Vmax		
Factor	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var
Strain	21.49	0.00	5.13	27.35	0.00	14.80	1.79	0.13	1.84	13.49	0.00	8.33
a_w	166.08	0.00	39.69	108.02	0.00	58.44	15.14	0.00	15.62	48.11	0.00	29.70
Θ	172.47	0.00	41.22	7.86	0.00	4.25	56.39	0.00	58.16	70.07	0.00	43.25
$a_w \times \Theta$	10.53	0.00	2.52	15.02	0.00	8.13	14.22	0.00	14.67	13.06	0.00	8.06
Strain $\times a_w$	13.21	0.00	3.16	16.70	0.00	9.04	5.00	0.00	5.16	7.20	0.00	4.44
Strain $\times \Theta$	33.68	0.00	8.05	8.89	0.00	4.81	3.41	0.00	3.52	9.07	0.00	5.60
Residual			0.24			0.54			1.03			0.62

Supplementary Table 6 - ANOVA results of the *F. poae* growth parameters (τ , K, r and Vmax). The value of Fisher's coefficient (F), the *p-value* (Pr(>F)) and the proportion of variance explained (% Var) by the effect of strain, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions ($a_w \times \Theta$, Strain $\times a_w$ and Strain $\times \Theta$) are reported for each growth parameters of *F. poae*. Pr(>F) highlighted in bold indicates the significance of the Fisher test.

	τ			K			r			Vmax		
Factor	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var
Strain	457.00	0.00	14.02	28.93	0.00	5.43	18.58	0.00	11.53	9.45	0.00	3.83
a_w	545.88	0.00	16.75	317.21	0.00	59.51	15.72	0.00	9.76	75.12	0.00	30.45
Θ	2,131.02	0.00	65.39	142.15	0.00	26.67	87.85	0.00	54.54	119.61	0.00	48.48
$a_w \times \Theta$	60.78	0.00	1.87	19.20	0.00	3.60	18.01	0.00	11.18	29.63	0.00	12.01
Strain $\times a_w$	14.39	0.00	0.44	16.97	0.00	3.18	13.62	0.00	8.46	7.12	0.00	2.89
Strain $\times \Theta$	48.75	0.00	1.50	7.61	0.00	1.43	6.29	0.00	3.90	4.77	0.00	1.94
Residual			0.03			0.19			0.62			0.41

Supplementary Table 7 - ANOVA results of the *F. tricinctum* growth parameters (τ , K, r and Vmax). The value of Fisher's coefficient (F), the *p-value* (Pr(>F)) and the proportion of variance explained (% Var) by the effect of strain, environmental factors (a_w and Θ) and their interactions ($a_w \times \Theta$, Strain $\times a_w$ and Strain $\times \Theta$) are reported for each growth parameters of *F. tricinctum*. Pr(>F) highlighted in bold indicates the significance of the Fisher test.

Factor	τ			K			r			Vmax		
	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var	F	Pr(>F)	% Var
Strain	127.09	0.00	5.53	22.52	0.00	9.40	11.75	0.00	14.29	8.81	0.00	12.96
a_w	166.67	0.00	7.25	122.10	0.00	50.95	27.56	0.00	33.52	10.03	0.00	14.76
Θ	1,921.17	0.00	83.59	42.26	0.00	17.63	15.83	0.00	19.25	31.53	0.00	46.40
$a_w \times \Theta$	46.41	0.00	2.02	40.29	0.00	16.81	5.09	0.00	6.19	4.07	0.00	5.99
Strain $\times a_w$	8.21	0.00	0.36	5.02	0.00	2.09	19.96	0.00	24.27	9.48	0.00	13.95
Strain $\times \Theta$	27.89	0.00	1.21	6.46	0.00	2.70	1.04	0.41	1.27	3.04	0.00	4.47
Residual			0.04			0.42			1.22			1.47

Supplementary Table 8 : Bayesian Information Criterion (BIC) of the different censored ANOVA models for mycotoxin production of the five *Fusarium* species. BIC value presented the effect of environmental factors (a_w and Θ) and their interaction ($a_w \times \Theta$) on mycotoxins produced by *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* and *F. tricinctum*. Models with significant BIC value are highlighted in bold.

Species	Factor	BIC
<i>F. avenaceum</i> (ENN)	Θ	704.2
	a_w	699.0
	Both factors	736.9
	Both + interaction	714.6
<i>F. graminearum</i> (TCTB)	Θ	932.5
	a_w	757.5
	Both factors	749.6
	Both + interaction	758.4
<i>F. langsethiae</i> (TCTA)	Θ	770.9
	a_w	438.7
	Both factors	429.9
	Both + interaction	454.5
<i>F. poae</i> (TCTA)	Θ	859.2
	a_w	775.4
	Both factors	834.8
	Both + interaction	791.8
<i>F. tricinctum</i> (ENN)	Θ	1,049.3
	a_w	1,063.1
	Both factors	1,041.2
	Both + interaction	1,014.3

Résumé des conclusions

Croissance :

- Les cinq espèces se développent à toutes les conditions environnementales testées (15, 20, 25 et 30°C aux $a_w = 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98$ et 0.99).
- Les facteurs environnementaux (a_w et température) ont un effet significatif sur la croissance de toutes les espèces étudiées
- La croissance de *F. graminearum* est favorisée par des températures élevées ($\geq 25^\circ\text{C}$).
- La croissance de *F. langsethiae* est favorisée par des températures basses (15 et 20°C) et des niveaux d' a_w élevés (> 0.96).
- La croissance de *F. poae* est favorisée aux températures hautes (25 et 30°C).
- L'effet de la diversité interspécifique est prédominant aux a_w faibles (< 0.97).
- L'effet de la diversité intraspécifique dépend des espèces.

Production de mycotoxines :

- De façon générale, une diminution de l' a_w entraîne une diminution de la production de mycotoxines.
- *F. graminearum* : production de TCTB augmente avec la température.
- *F. avenaceum* et *F. tricinctum* : production d'ENN augmente avec la température.
- *F. langsethiae* et *F. poae* : production de TCTA diminue avec la température.

→ Différentes réponses des espèces aux conditions environnementales

PARTIE 2 : Écophysiologie des espèces de *Fusarium* en cocultures

Introduction

En Europe, toutes les cultures céréalières sont concernées par le problème de sécurité sanitaire lié aux mycotoxines. La littérature a largement démontré que la fusariose de l'épi de blé (FHB), causée par un mélange d'espèces fusariennes sur les grains, est un problème particulièrement complexe (Arseniuk et al., 1999; Boutigny et al., 2019). La distribution de ces espèces et la production de mycotoxines sont étroitement liées aux conditions environnementales (Van Der Lee et al., 2015; Valverde-Bogantes et al., 2020) et aux interactions compétitives qui se jouent au sein de la niche écologique (Marin et al., 1998; Audenaert et al., 2013; Siou et al., 2015). Dans ce manuscrit, nous définirons les interactions compétitives comme la capacité d'une espèce à se développer plus facilement au détriment d'une autre, en termes de croissance et/ou de production de mycotoxines. Ceci résultant du partage de la même niche écologique et donc de l'accès à des ressources communes dans le cadre de nos travaux.

La distribution des espèces fusariennes, comme *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* qui sont fréquemment associées à la FHB en Europe, peut varier selon les régions et les années, leur réponse face aux facteurs abiotiques ayant largement été discutée dans la littérature (Boutigny et al., 2019; Cobo-Díaz et al., 2019a; Kokkonen et al., 2010; Van Der Lee et al., 2015; Banik et al., 2018; Nogueira et al., 2018; Valverde-Bogantes et al., 2020; Gautier et al., 2020a). Les changements climatiques, en particulier l'augmentation des températures, pourraient modifier la distribution de ces espèces en favorisant le développement de certaines par rapport à d'autres. Par exemple, *F. poae* est plus favorisé par les températures élevées que *F. graminearum* ou *F. avenaceum* (Van Der Lee et al., 2015 ; Banik et al., 2018 ; Nogueira et al., 2018 ; Valverde-Bogantes et al., 2020). Dans ce contexte, l'un des points clés est de comprendre comment les facteurs environnementaux peuvent avoir un impact sur le comportement des espèces de *Fusarium* en interactions, dans le but de mettre en évidence de potentielles caractéristiques écophysiologiques propres aux cocultures. À ce jour, peu d'études se sont intéressées aux interactions interspécifiques entre les *Fusarium*, la plupart s'intéressant à l'agressivité des espèces sur les plantes plutôt qu'à la compétition entre les espèces. Par exemple, certaines études ont été menées *in vitro* sur milieu synthétique (Cooney et al., 2001) ou sur grain (Simpson et al., 2004) et d'autres *in planta* (Xu et al., 2007; Picot et al., 2012). Siou et al. (2015) ont étudié la compétition entre *F. graminearum* et *F. poae* sur épi de blé et Tan et al. (2020) sur

épis et feuille de blé. Enfin, certains auteurs se sont également intéressés à l'effet des facteurs environnementaux, telles que la température, l'humidité ou l'activité de l'eau, sur le comportement des espèces en coculture (Velluti et al., 2000; Xu et al., 2007). Les conclusions entre ces études n'ont pas toujours concordé car les couples d'espèces en compétition ou encore les conditions de culture n'étaient pas les mêmes. Aujourd'hui, il s'avère donc indispensable de préciser les caractéristiques écophysiological des espèces en coculture dans le but de mieux comprendre les interactions interspécifiques associées au développement de la FHB.

L'objectif de cette deuxième partie du Chapitre 2 est de mettre en évidence les différents effets de deux facteurs environnementaux (température et a_w) sur la croissance et la production de mycotoxines des espèces fusariennes en interactions. Les expérimentations seront menées *in vitro* et sur milieu synthétique afin de définir des caractéristiques écophysiological propres à chaque coculture. Le but de ces travaux étant de proposer des conclusions précises sur le comportement des espèces en coculture. Cette partie s'articulera autour de deux parties : i) la première traitant de l'effet de la température et de l' a_w sur les quantités d'ADN et de mycotoxines produites dans les cocultures de *F. graminearum* avec *F. avenaceum* ou *F. poae* et ii) la seconde traitant de l'effet d'une augmentation de température sur les profils métabolomiques de la coculture *F. graminearum* avec *F. poae*.

PARTIE 2.1 : Croissance et production de mycotoxines au sein des cocultures

Objectifs

Alors que les facteurs environnementaux sont susceptibles d'influencer significativement les profils de mycotoxines produites par des espèces fongiques lorsqu'elles co-occurrent, très peu d'études se sont attachées à décrire ces effets.

Aussi l'objectif de cette partie est d'étudier l'effet des variations de température et d' a_w sur la croissance et la production de mycotoxines de couples d'espèces fréquemment retrouvées sur les épis, à savoir *F. graminearum* en interaction avec *F. avenaceum* ou *F. poae*. La quantification d'ADN de chaque espèce et l'analyse des mycotoxines permettront d'illustrer les différences de développement et de production de mycotoxines des espèces en compétition, en réponse aux variations environnementales.

Matériels et méthodes

1. Préparation des échantillons fongiques

Choix des espèces et des souches. Trois espèces de *Fusarium* ont été ciblées pour cette analyse en coculture: *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae*. Cinq souches différentes de *F. graminearum* (I156, I159, I164, I178 et I181) ont été mises en culture avec la souche de *F. poae* (I72) ou la souche de *F. avenaceum* (I495). Ces souches ont été présentées dans la partie 1 du chapitre 2 (voir Supplementary Table 1, pages 124-125).

Préparation du milieu de culture, production de spores, inoculation et arrêts des cultures. Toutes les étapes de préparation du milieu de culture, production de spores et d'inoculation ont été réalisées comme décrit dans le chapitre 2 (voir parties « Culture media », « Spore production » et « Inoculation and study of fungal growth » ; pages 108-109), avec les modifications suivantes :

- Les inoculations ont été réalisées en plaque 24 puits, dans un volume final de 2 mL.
- Chaque espèce dans la coculture a été inoculée à une concentration de $8,0 \cdot 10^3$ spores.mL⁻¹ (50 :50 ; v/v).
- Les blancs (puits non inoculés) représentaient ¼ des puits.
- 6 conditions de température et d'activité de l'eau (a_w modifiée avec l'ajout de glycérol) ont été étudiées : températures (Θ) 25 et 30 °C et $a_w = 0.95, 0.97$ et 0.99 .
- Les arrêts de culture ont été réalisés après 14 jours d'incubation, après avoir mesuré la densité optique (DO).
- Après arrêt des cultures, le mycélium n'a pas été rincé.
- Les quantités d'ADN ont été mesurées, après 14 jours de culture, dans les mycéliums conservés à -20 °C.
- Les concentrations en mycotoxines ont été mesurées, après 14 jours de culture, dans les surnageants de culture conservés à -20 °C .

2. Méthodes pour l'analyse de la croissance fongique

Extraction d'ADN. L'ADN fongique a été extrait à partir des mycéliums lyophilisés transférés en tubes micronix (format plaques 96 puits), en utilisant un protocole d'extraction au cetyltriméthylammonium bromure (CTAB ; Annexe 5). La qualité d'ADN extrait a été contrôlée par dosage en spectrophotométrie (DeNovix, DeNovix, Wilmington DE, USA).

Quantification de l'ADN par PCR quantitative. L'ADN de chaque espèce en coculture a été quantifié par PCR quantitative (qPCR) avec détection au SYBR green à l'aide du QuantStudio5™ (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finlande). L'abondance de l'ADN de chaque espèce en coculture a été évaluée par la quantification du gène EF1 α grâce à des amorces spécifiques à *F. graminearum*, *F. poae* et *F. avenaceum*, respectivement (Tableau 1). Chaque réaction de qPCR contenait 5 μ L de PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix 2 X (appliedBiosystems™), 0.5 μ L de chaque amorce à 10 μ M et 3 μ L d'eau DNase-RNase free pour 1 μ L d'ADN génomique. Les amplifications ont été réalisées selon le programme suivant : une première étape de dénaturation de 20 s à 95 °C ; suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 1 sec et d'hybridation à 60 °C pendant 20 s. La courbe de fusion a été générée en utilisant le profil suivant : 1 s à 95 °C, 20 s à 60 °C et 1 s à 95 °C. Toutes les réactions ont été réalisées en triplicatas. La quantification a été réalisée à l'aide de courbes d'étalonnage externes avec des gammes standards d'ADN de *F. graminearum*, *F. poae* et *F. avenaceum*, respectivement extraits à partir de cultures pures. La quantité d'ADN de chaque espèce a été exprimée en proportion d'ADN d'une espèce par rapport à l'autre, dans chaque coculture.

Tableau 1 : Couples d'amorces utilisés pour la quantification d'ADN fongique par qPCR.

Espèce	Amorce forward (5'-3')	Amorce reverse (5'-3')
<i>F. graminearum</i>	EF1-FCFG_F : TCGATACGCGCCTGTTACC	EF1-FG_R : ATGAGCGCCCAGGGAATG
<i>F. avenaceum</i>	EF1-FA_F2 : CATCTTGCTAACTCTTGACAGACCG	EF1-FA_R3 : GGGTAATGAATGCGTTTCGAA
<i>F. poae</i>	EF1-FP2_F : CTCGAGCGATTGCATTTCTTT	EF1_FP2_R : GGCTTCCTATTGACAGGTGGTT

3. Méthodes pour l'analyse des mycotoxines

Les mycotoxines ont été extraites et quantifiées comme décrit dans la première partie du Chapitre 2 (voir parties « Study of mycotoxin production » et « Mycotoxins analysis », pages 109-111).

4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec R (version 4.1.0). Les comparaisons de moyennes et les différents tests de significativité ont été réalisés par des analyses de variances (ANOVA) suivies d'un test post hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). La significativité de l'effet des facteurs environnementaux sur les quantités d'ADN et de mycotoxines a été testée par des analyses de variance (ANOVA).

Résultats et discussion

1. Observation de la croissance fongique

Au total, 360 puits ont été inoculés pour les cocultures *F. graminearum* / *F. avenaceum* (FG/FA) et *F. graminearum* / *F. poae* (FG/FP), respectivement. Pour les cocultures FG/FA, une croissance mycélienne a été observée dans 68 % des puits, contre 83% pour les cocultures FG/FP.

Pour la suite des analyses, nous nous intéresserons uniquement aux échantillons pour lesquels une croissance mycélienne a été observée après 14 jours de culture. Ainsi, un total de 144 et 150 échantillons pour les cocultures FG/FA et FG/FP, respectivement, a été analysé pour les quantifications d'ADN et de mycotoxines, après 14 jours de culture.

Aucune coculture FG/FP ne s'est développée à 30 °C et $a_w = 0.95$, quelle que soit la souche de *F. graminearum* (30 puits). À 30 °C, $a_w = 0.95$ et 0.97 , les cocultures FG/FA ne se sont développées que pour les souches I178 et I181 (24 puits).

2. Étude du développement fongique dans les cocultures en réponse à des variations environnementales

2.1. Présentation des données de quantification d'ADN

Parmi les échantillons analysés, l'ADN de *F. graminearum* ou de l'espèce en compétition (*F. avenaceum* ou *F. poae*) n'a pas toujours été détecté en qPCR, malgré l'observation de croissance fongique. Les quantités d'ADN mesurées ont pu être exploitées pour 105 échantillons (73 %) des cocultures FG/FA et 126 échantillons (84 %) des cocultures FG/FP.

Les proportions d'ADN de *F. graminearum* quantifiées en cocultures avec *F. avenaceum* et *F. poae* sous différentes conditions environnementales sont représentées sur la Figure 1. De façon générale, nous avons mis en évidence des différences significatives entre les quantités d'ADN dans les cocultures FG/FA et FG/FP ($p\text{-value} = 4,0.10^{-6}$). En effet les quantités d'ADN de *F. graminearum* étaient majoritaires en coculture avec *F. avenaceum* (proportions moyennes de 86, 94, 73,

100 et 44 %, à 25 °C, $a_w = 0.95$, 0.99 et 30 °C, $a_w = 0.95$, 0.97, 0.99, respectivement ; Figure 1). Au contraire pour les cocultures FG/FP, les quantités d'ADN de *F. graminearum* étaient significativement inférieures à celles de *F. poae* (proportion moyenne d'ADN de *F. graminearum* de 4, 10 et 0 % à 25 °C, $a_w = 0.95$, 0.97 et 30 °C, $a_w = 0.97$, respectivement ; $p\text{-value} < 0.05$), à l'exception de la condition de culture à 25 °C et $a_w = 0.99$ (proportion moyenne d'ADN de *F. graminearum* de 49 % ; Figure 1). Ces résultats suggèrent que, dans nos conditions de culture, *F. graminearum* serait plus compétitif face à *F. avenaceum* que face à *F. poae*. Tan et al. (2020) ont également observé une réduction de l'occurrence de *F. graminearum* sur épis et feuilles de blé, en présence de *F. poae*.

2.2. Étude de la diversité intraspécifique chez *F. graminearum*

Aucune différence significative n'a été observée entre les quantités d'ADN des cinq souches de *F. graminearum*, quelle que soit l'espèce en coculture ($p\text{-values} = 0.12$ et 0.37 pour *F. avenaceum* et *F. poae*, respectivement ; Annexes 6 et 7). Ces résultats suggèrent un niveau de compétitivité comparable entre les différentes souches de *F. graminearum* étudiées. Toutefois, Siou et al. (2015) ont mis en évidence des souches de *F. graminearum* plus compétitives que d'autres, en confrontations sur épis de blés. Par exemple, ces auteurs ont observé que les quantités d'ADN fongique de la souche I159 étaient généralement inférieures aux autres espèces dans les co-inoculations, comme par exemple la souche I178, également étudiée dans nos travaux. Le fait que nos résultats *in vitro* ne concordent pas avec ceux sur épis de blé présentés par ces mêmes auteurs soulève la problématique du choix du milieu de culture pour étudier les réponses écophysiological des espèces de *Fusarium*.

2.3. Étude de l'effet des facteurs environnementaux.

Enfin, nous avons mis en évidence différents effets des facteurs environnementaux sur les espèces en coculture. En effet, nous avons observé un impact significatif de la température sur les quantités d'ADN de *F. graminearum*, quelle que soit l'espèce en coculture ($p\text{-values} = 2,9 \cdot 10^{-3}$ et 0,026 pour *F. avenaceum* et *F. poae*, respectivement). Au contraire, seul l'effet de l' a_w a été observé comme significatif sur les quantités d'ADN de *F. avenaceum* et *F. poae*, respectivement en coculture avec *F. graminearum*

(p -values = $1,7 \cdot 10^{-6}$ et $3,7 \cdot 10^{-3}$, respectivement). Dans la partie 1 du chapitre 2, nous avons mis en évidence que chacune des espèces possédait des caractéristiques écophysiologicals spécifiques en monoculture, en réponse aux variations environnementales. Nos observations en coculture concordent avec ces résultats, chaque coculture présentant également ses propres caractéristiques écophysiologicals.

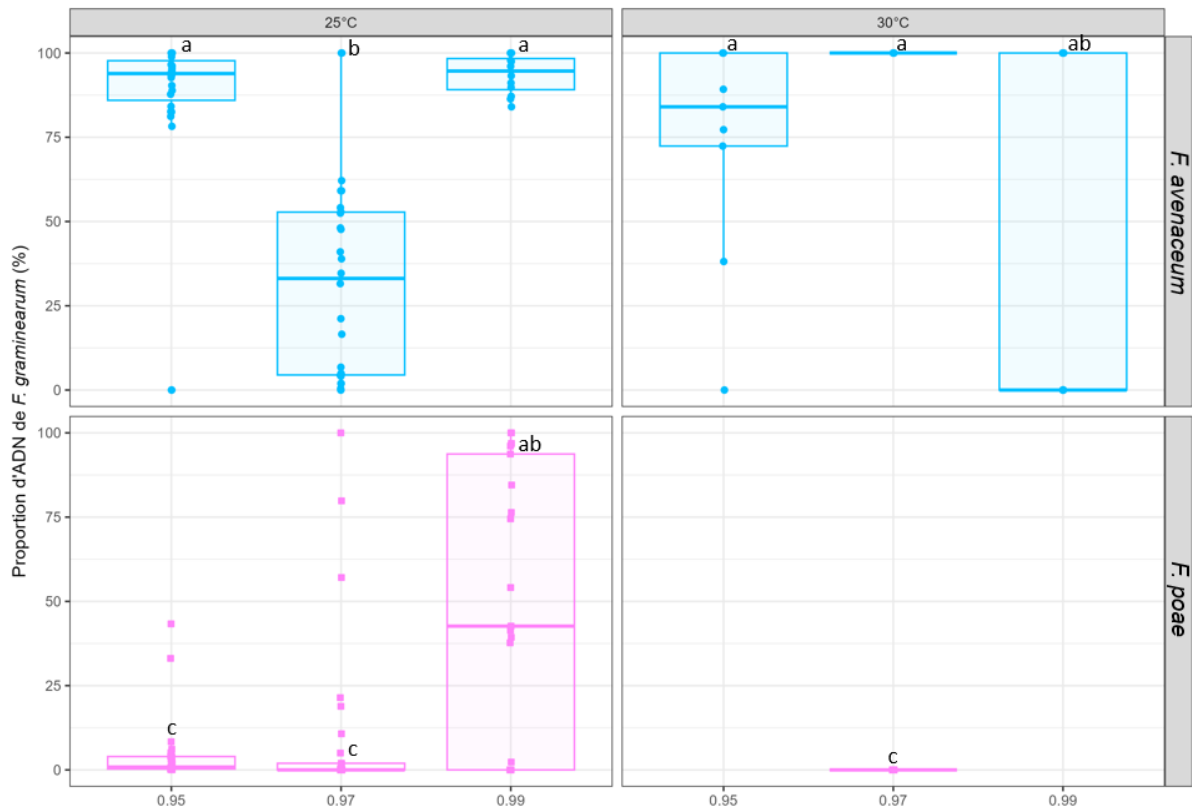


Figure 1 : Quantités d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum* ou *F. poae*, sous différentes conditions environnementales. Les proportions d'ADN de *F. graminearum* (axe des ordonnées) ont été calculées en fonction des quantités d'ADN de l'espèce en coculture : *F. avenaceum* (en bleu) ou *F. poae* (en rose). Les différentes conditions d' a_w sont représentées sur l'axe des ordonnées et les températures sont en colonnes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les proportions (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

3. Étude de la production de mycotoxine dans les cocultures en réponse à des variations environnementales

3.1. Présentation des données : présence / absence des mycotoxines

La Figure 2 présente le nombre de puits, parmi les 144 et 150 échantillons des cocultures FG/FA et FG/FP, respectivement, dans lesquels des mycotoxines ont été détectées et quantifiées.

Nous avons d'abord constaté qu'aucune mycotoxine n'a été détectée dans les cocultures à l' $a_w = 0.95$, quelle que soit la température. Il en a été de même à 30 °C, pour l' $a_w = 0.97$ (Figure 2).

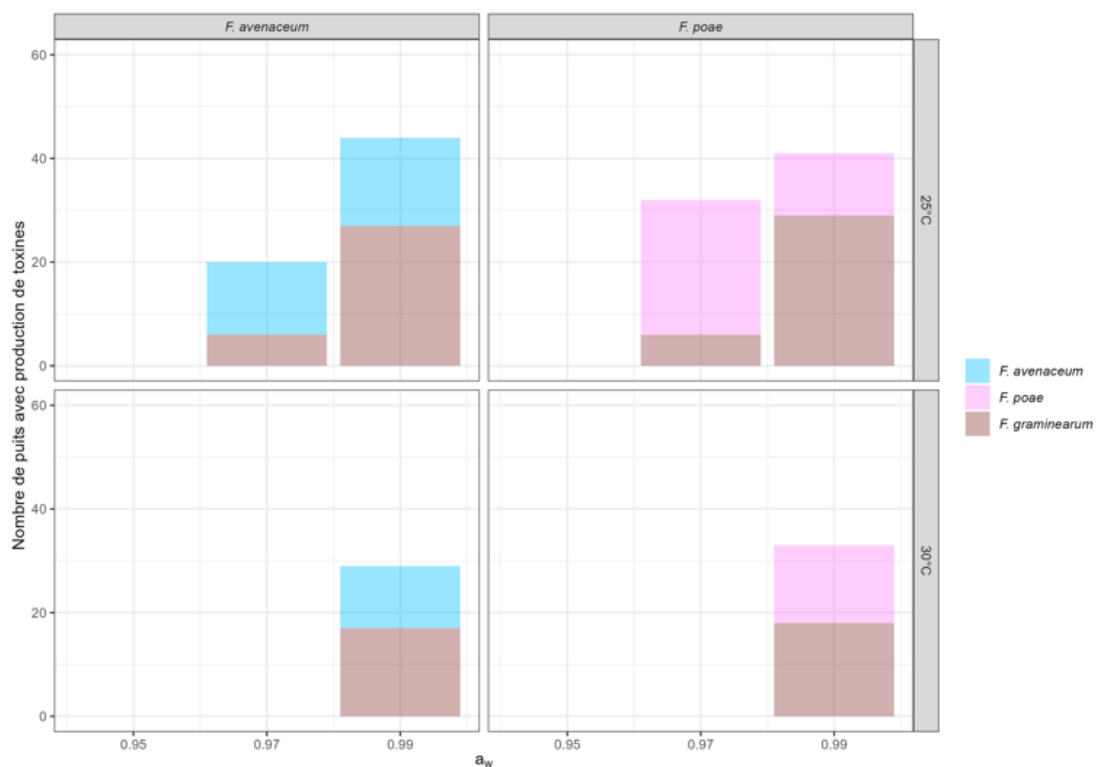


Figure 2 : Production de mycotoxine dans les cocultures sous différentes conditions environnementales. Le nombre de puits dans lesquels des mycotoxines produites par *F. graminearum* ou *F. avenaceum* en coculture (à gauche) et *F. graminearum* ou *F. poae* en coculture (à droite) sont renseignés sur l'axe des ordonnées. Les différentes conditions d' a_w sont représentées sur l'axe des abscisses et les températures en lignes.

De façon générale, à l' $a_w = 0.99$ et quelle que soit la température, les mycotoxines produites par *F. graminearum* ont le plus souvent été détectées dans les cocultures, en comparaison avec les mycotoxines produites par *F. avenaceum* ou *F. poae*. Au

contraire, dans les conditions de culture plus contraignantes (25 °C et $a_w = 0.97$), les mycotoxines produites par *F. graminearum* ont moins souvent été détectées. En effet, les mycotoxines de *F. avenaceum* ont été détectées dans 14 puits, contre 6 puits pour les mycotoxines de *F. graminearum* (Figure 2). De même pour les mycotoxines de *F. poae* identifiées dans 26 puits, contre 6 pour *F. graminearum* (Figure 2).

3.2. Effet des facteurs environnementaux sur la production de mycotoxines par *F. graminearum* et *F. avenaceum* en coculture

Les Figures 3 et 4 présentent les quantités de DON et ADON produites par *F. graminearum* et d'ENN produites par *F. avenaceum*, respectivement, dans la coculture. Les mycotoxines de *F. graminearum* ont été produites en plus grande quantité (moyenne = 5 667 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) que celles de *F. avenaceum* (moyenne = 130 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

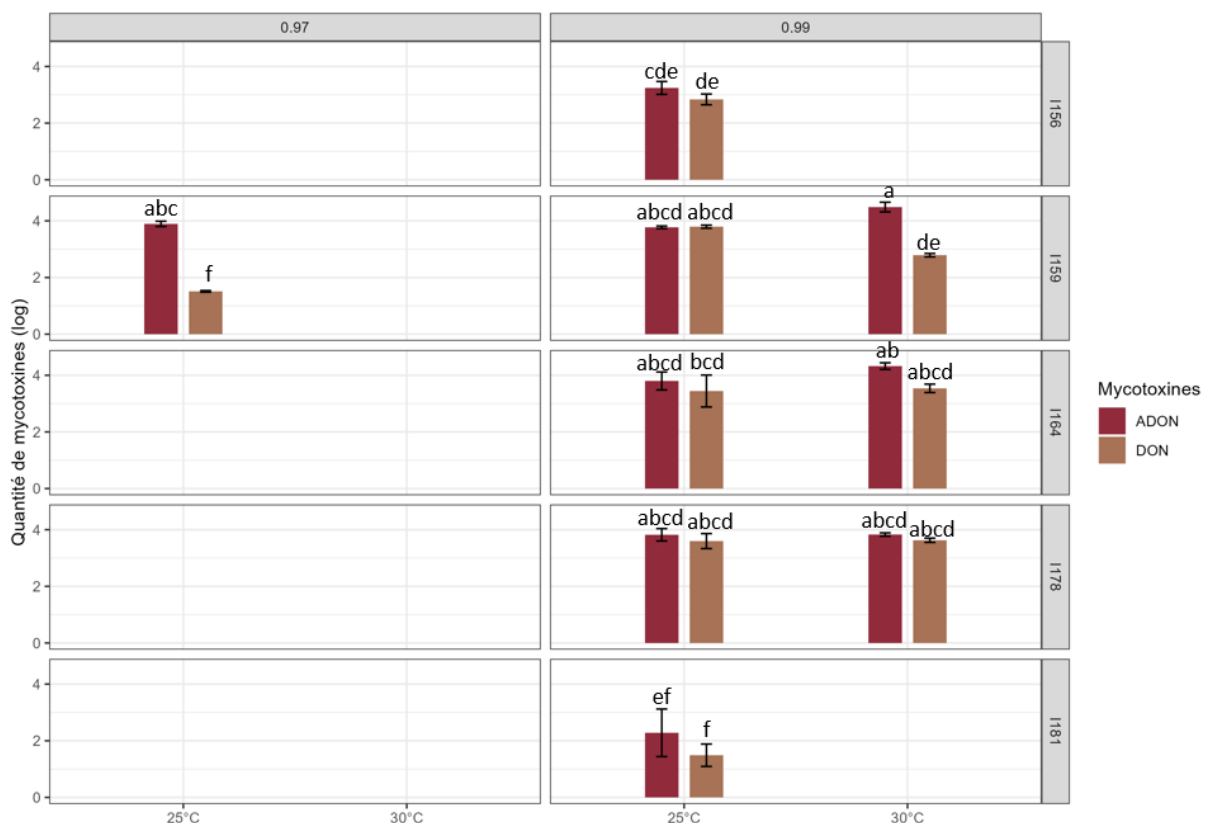


Figure 3 : Quantités de DON et ADON produites par les différentes souches de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum*, sous différentes conditions environnementales. Les quantités de DON et ADON, exprimées en logarithme de la concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sont représentées sur l'axe des ordonnées pour les différentes souches de *F. graminearum* (en lignes). Les différentes conditions de température sont représentées sur l'axe des abscisses et les conditions d' a_w sont représentées en colonnes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les quantités de mycotoxines (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

Toutes les souches de *F. graminearum* ont produit du DON et ADON (Figure 3), dans des quantités variables (p -value = 0.028). Les ENN ont été produites par *F. avenaceum* en coculture avec n'importe quelle souche de *F. graminearum* (p -value > 0.05), à l'exception de la I178 (Figure 4). Ces résultats suggèrent de la diversité intraspécifique chez *F. graminearum*, en termes de production de DON et ADON dans les cocultures avec *F. avenaceum*. Cette même conclusion a été mise en évidence par Siou et al. (2015). Ces auteurs ont en effet observé des différences de production de DON par quatre souches de *F. graminearum*, inoculées sur épis de blés avec d'autres espèces fongiques du genre *Fusarium* ou *Microdochium*.

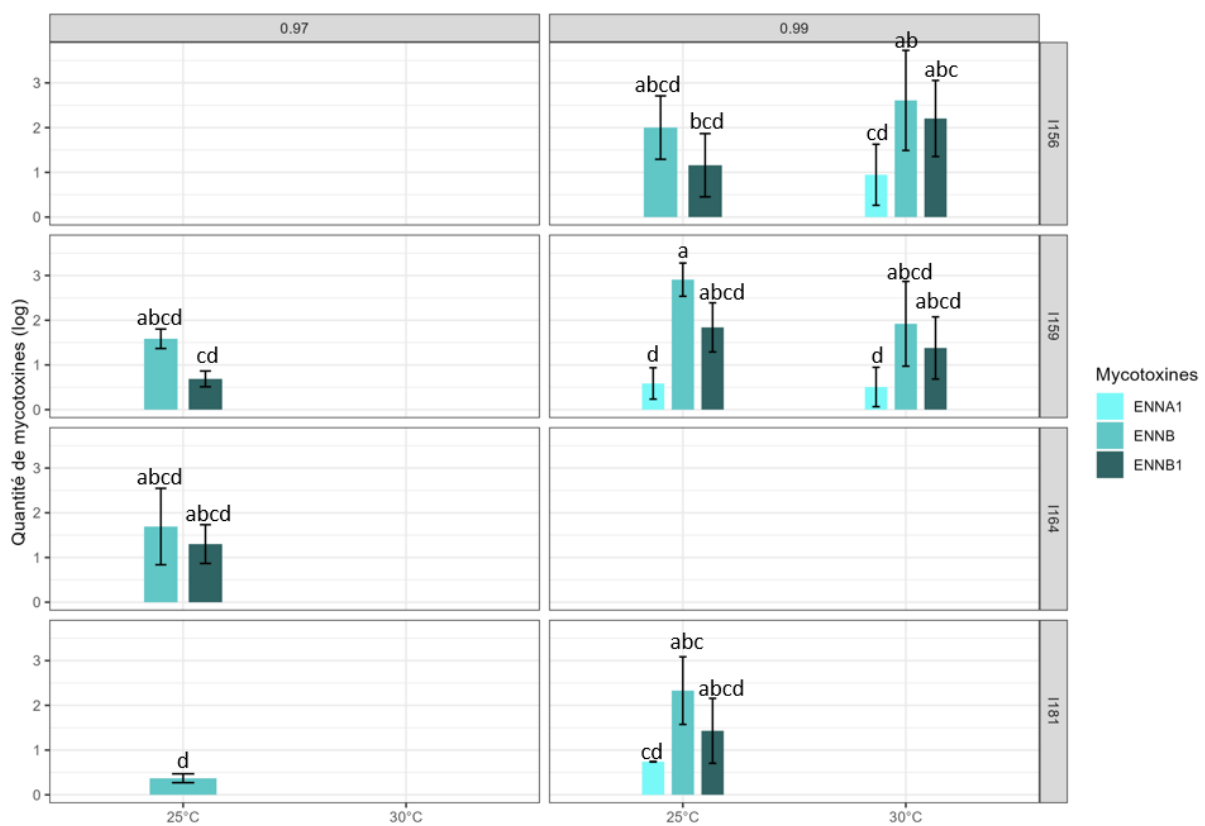


Figure 4 : Quantités d'ENN produites par *F. avenaceum* en coculture avec différentes souches de *F. graminearum*, sous différentes conditions environnementales. Les quantités d'ENNA1, B et B1, exprimées en logarithme de la concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sont représentées sur l'axe des ordonnées en fonction des différentes souches de *F. graminearum* (en lignes). Les différentes conditions de température sont représentées sur l'axe des abscisses et les conditions d' a_w sont représentées en colonnes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les quantités de mycotoxines (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

Nous avons également mis en évidence que les mycotoxines de *F. graminearum* (DON et ADON) ont été produites préférentiellement à l' $a_w = 0.99$, quelle que soit la température (Figure 3) ; tandis que celles de *F. avenaceum* (ENNA1, ENNB et ENNB1) ont également été produites à l' $a_w = 0.97$ (Figure 4). De plus, l'ENNA1 n'était généralement produite qu'à l' $a_w = 0.99$, contrairement aux ENNB et B1. Ces résultats

suggèrent différents effets des facteurs environnementaux sur la production de mycotoxines des deux espèces dans la coculture. Ces observations ont en partie été confirmées par l'effet significatif de la température ($p\text{-value} = 5,3.10^{-4}$) sur les quantités de DON et d'ADON. Au contraire, aucun effet de la température n'a été mis en évidence sur la production de mycotoxines par *F. avenaceum*, tout comme l' a_w qui n'a pas impacté la production d'ENN ou de DON et ADON dans la coculture ($p\text{-value} > 0.05$).

3.3. Effet des facteurs environnementaux sur la production de mycotoxines par *F. graminearum* et *F. poae* en coculture

Les Figures 5 et 6 présentent les quantités de DON et ADON produites par *F. graminearum* et de DAS produites par *F. poae*, respectivement, dans la coculture. Les mycotoxines de *F. graminearum* ont été produites en plus grande quantité (moyenne = $10\ 634\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) que celles de *F. poae* (moyenne = $5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$).

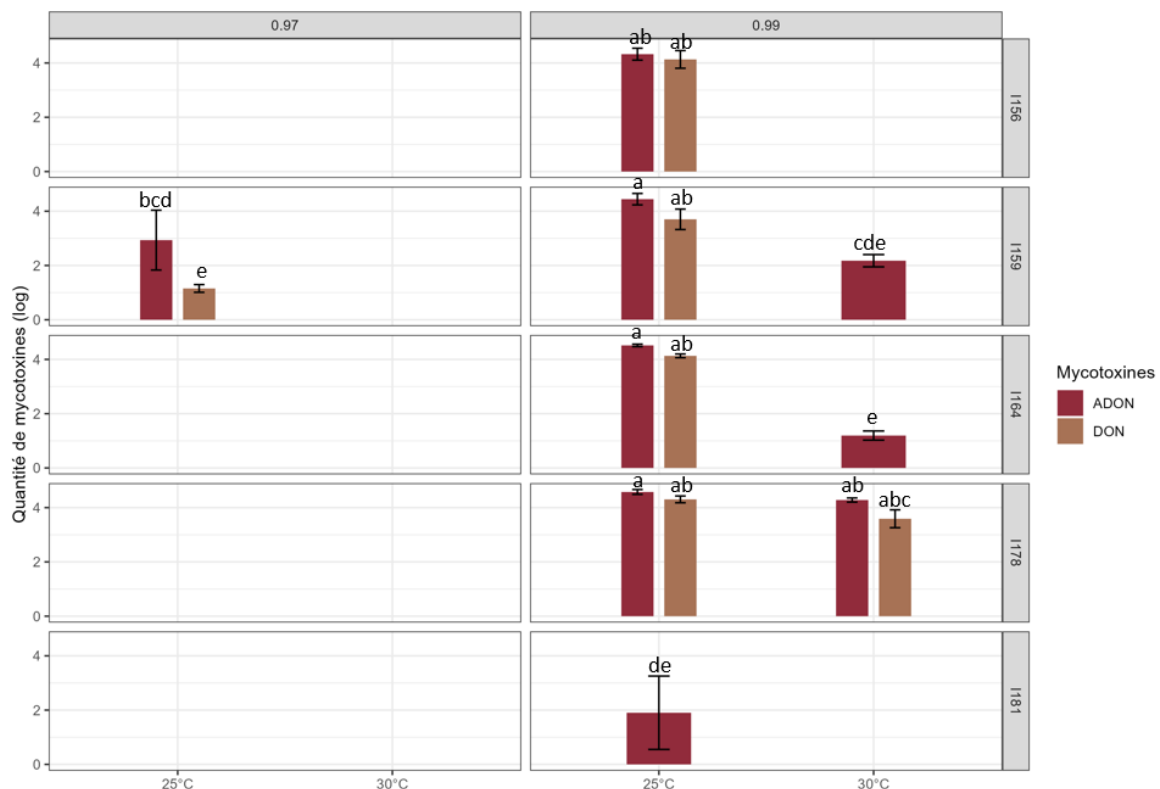


Figure 5 : Quantités de DON et ADON produites par les différentes souches de *F. graminearum* en coculture avec *F. poae*, sous différentes conditions environnementales. Les quantités de DON et ADON, exprimées en logarithme de la concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sont représentées sur l'axe des ordonnées pour les différentes souches de *F. graminearum* (en lignes). Les différentes conditions de température sont représentées sur l'axe des abscisses et les conditions d' a_w sont représentées en colonnes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les quantités de mycotoxines (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

Toutes les souches de *F. graminearum* ont produit du DON et ADON (Figure 5), dans des quantités variables ($p\text{-value} = 9,5.10^{-4}$). De même, la DAS a été produite, dans des quantités différentes (Figure 6), par *F. poae* en coculture avec n'importe quelle souche de *F. graminearum* ($p\text{-value} = 5,2.10^{-6}$). Nos résultats suggèrent différentes productions de mycotoxines par la coculture FG/FP, en réponse à la diversité intraspécifique des souches de *F. graminearum*.

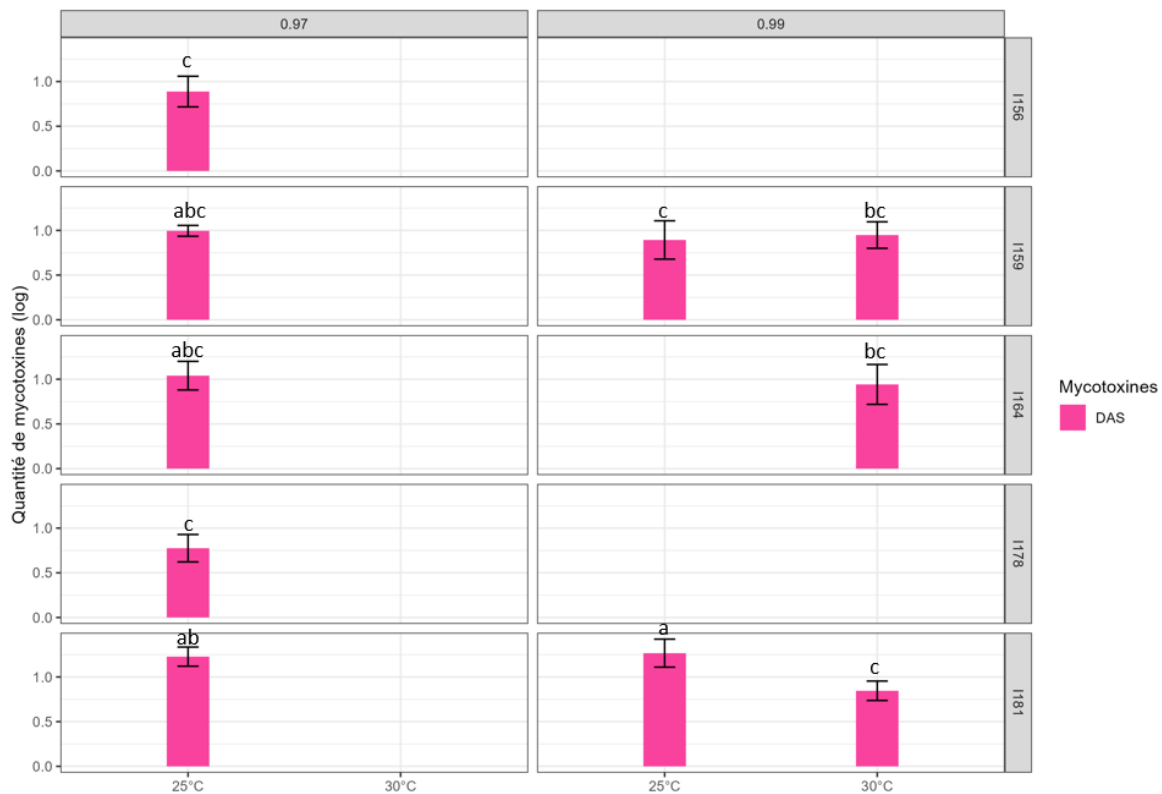


Figure 6 : Quantités de DAS produites par *F. poae* en coculture avec différentes souches de *F. graminearum*, sous différentes conditions environnementales. Les quantités de DAS, exprimées en logarithme de la concentration en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sont représentées sur l'axe des ordonnées en fonction des différentes souches de *F. graminearum* (en lignes). Les différentes conditions de température sont représentées sur l'axe des abscisses et les conditions d' a_w sont représentées en colonnes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les quantités de mycotoxines (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

Nous avons mis en évidence que les mycotoxines de *F. graminearum* (DON et ADON) ont été produites préférentiellement à l' $a_w = 0.99$, quelle que soit la température (Figure 5). Au contraire, la DAS ne semble pas avoir été produite de façon préférentielle, ayant été détectée autant à l' $a_w = 0.97$ que 0.99 ou qu'à 25 ou 30 °C (Figure 6). Ces résultats suggèrent différents effets des facteurs environnementaux sur la production de mycotoxines des deux espèces dans la coculture. Ces observations ont été confirmées par l'effet significatif de la température sur les quantités de DON et d'ADON ou de DAS ($p\text{-values} = 9,1.10^{-8}$ et $5,0.10^{-3}$, respectivement). Nous avons également mis en

évidence un effet significatif de l' a_w sur la production de DON et ADON par *F. graminearum* (p -value = $1,6.10^{-4}$).

4. Relations entre les quantités d'ADN et de mycotoxines dans les cocultures

Nous n'avons pas mis en évidence de relation entre les productions de mycotoxines et les quantités d'ADN. Ceci est en adéquation avec les études de Siou et al. (2015) qui ont été menées *in planta* et qui ont mis en évidence que la compétition interspécifique n'induisait pas une augmentation significative de la production de mycotoxines.

Cependant, d'autres études ont montré le contraire. En effet, une relation proportionnelle entre les quantités d'ADN et de mycotoxines produites a été mise en évidence par Simpson et al. (2004). Ces auteurs ont observé une réduction de la production de DON par *F. culmorum* en compétition avec *Microdochium majus*, en comparaison avec des monocultures de *F. culmorum*. Ceci soulève l'importance de pouvoir comparer les caractéristiques écophysiologiques des espèces en monoculture et en coculture.

Dans notre étude, l'absence de relation entre la production de mycotoxines et les quantités d'ADN dans les cocultures suggère que la production de mycotoxines ne serait pas impliquée dans la compétition interspécifique. Nos études ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'induction de la production de mycotoxines par la présence d'une autre espèce en coculture. Cependant, ceci pourrait être étudié par le suivi de l'expression des gènes de biosynthèse des mycotoxines par les différentes espèces en coculture.

Nos travaux nous ont permis de soulever l'hypothèse que les facteurs environnementaux impacteraient fortement les caractéristiques écophysiologiques des espèces de *Fusarium* en cocultures. Les travaux de Xu et al. (2007) ont également amené à cette conclusion. En effet, ces auteurs ont établi que l'augmentation de la production de NIV et de DON, respectivement produit par *F. poae* et *F. graminearum* dans différentes cocultures, résultait des hautes températures et de l'humidité lors de la phase d'infection de l'épi de blé.

Résumé des conclusions

Quantité d'ADN :

- Cocultures FG/FA : *F. graminearum* majoritaire.
- Cocultures FG/FP : *F. poae* majoritaire.
- *F. graminearum* est plus compétitif face à *F. avenaceum* que face à *F. poae*.
- Effet de la température sur les quantités d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum* ou *F. poae*.
- Effet de l' a_w sur les quantités d'ADN de *F. avenaceum* et *F. poae*, respectivement en coculture avec *F. graminearum*.

Production de mycotoxines :

- Cocultures FG/FA et FG/FP: mycotoxines de *F. graminearum* (DON + ADON) majoritaires.
- Effet de la diversité intraspécifique de *F. graminearum* sur la production de mycotoxines dans les cocultures .
- Effet de la température sur la production de DON et ADON par *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum* ou *F. poae*. Également sur la production de DAS par *F. poae*.
- Effet de l' a_w sur la production de DON et ADON par *F. graminearum* en coculture avec *F. poae*.

→ Les conditions environnementales modulent l'équilibre espèce/mycotoxines

**PARTIE 2.2 : Étude du profil
métabolomique de *F. graminearum* et
F. poae en coculture, sous contrainte
thermique**

Objectifs

L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet d'une augmentation de la température sur la croissance et le profil métabolique de *F. graminearum* et de *F. poae* en interaction. Ceci a été réalisé dans le cadre du projet d'échange SEP-CONACyT-ANUIES-ECOS-NORD (315673) avec l'Institut d'écologie INECOL à Xalapa, au Mexique. J'ai été accueillie par l'équipe de recherche moléculaire avancée du laboratoire de chimie des produits naturels. J'ai été encadrée par le coordinateur de l'équipe, Docteur José Antonio Guerrero-Analco, ainsi que le Docteur Juan Luis Monribot-Villanueva, chimiste des produits naturels, dans l'objectif de développer une partie de mon projet de thèse. Ainsi, j'ai eu l'occasion de séjourner un mois dans leurs locaux pour approfondir mes recherches sur les espèces de *Fusarium* en coculture.

Dans la partie 2.1 du chapitre 2, nous avons mis en évidence l'effet de la température sur la production de mycotoxines par *F. graminearum* et *F. poae* en coculture (partie 2.1 du chapitre 2). De plus, le couple de souche I156/I72 semblait le plus impacté par les conditions environnementales, la production de mycotoxine spécifique à *F. graminearum* et *F. poae* n'ayant pas été identifiée pour toutes les conditions de culture. Cette coculture a donc été sélectionnée dans le but d'étudier l'effet de l'augmentation de la température sur son profil métabolomique.

La coculture I156/I72 a été cultivée *in vitro* à 25 °C et 30 °C. Le développement de chaque espèce a été mesuré en un point final et quantifié par qPCR ciblant une région spécifique du gène EF1 α , pour *F. graminearum* et *F. poae*, respectivement. Une analyse métabolomique non ciblée a été réalisée par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution afin d'observer les différents profils métabolomiques des espèces en compétition, aux deux températures.

Matériels et Méthodes

1. Préparation des échantillons fongiques

Choix des espèces et des souches. La souche *F. graminearum* (I156) et la souche *F. poae* (I72), provenant de la collection INRAE, ont été utilisées (voir Supplementary Table 1, pages 124-125). Quatre types d'échantillons ont été traités : les contrôles négatifs, les souches I156 et I72 en monoculture et la coculture I156/I72 (Tableau 1). Les contrôles négatifs ont été traités comme le reste des échantillons mais sans inoculation avec des spores.

Tableau 1 : Récapitulatif des échantillons analysés à 25°C et 30°C. Le nombre de réplica étudié est indiqué pour chaque échantillon, aux deux températures testées. Les contrôles correspondent aux témoins négatifs, les souches de *F. graminearum* et *F. poae* ont été inoculées seules (I156 et I72) et en coculture (I156/I72).

Echantillon	25°C	30°C
Contrôle négatif	3	3
<i>F. graminearum</i> (I156)	3	3
<i>F. poae</i> (I72)	3	3
Coculture (I156/I72)	3	3

Milieu de culture, production de spores et inoculation. Les spores ont été produites et conservées à -80 °C, à une concentration finale de $1,33.10^6.mL^{-1}$, comme expliqué dans le matériel et méthode de la partie 1 du Chapitre 2 (paragraphe « spore production », page 109). Les monocultures et les cocultures ont été inoculées à une concentration finale de $1,66.10^4.mL^{-1}$ dans des boites de Petri contenant 8 mL de MS-saccharose (pour la composition du milieu de culture, voir matériel et méthode de la partie 1 du Chapitre 2, paragraphe « culture media », pages 108-109). Pour la coculture (I156/I72), les spores ont été inoculées à concentration égale (50 :50 ; v/v ; soit $8,31.10^3.mL^{-1}$ de chaque souche). Trois réplicas techniques (trois boites de Petri) ont été réalisés pour chacun des trois réplicas biologiques (Tableau 1). Après inoculation, les échantillons ont été incubés à 25 °C et 30 °C pendant 14 jours. Les trois réplicas biologiques ont ensuite été mélangés puis centrifugés à 4 800 g pendant 20 minutes. Les surnageants ont été congelés dans l'azote liquide puis lyophilisés pour les analyses métaboliques et les mycéliums ont été congelés à -80 °C avant d'être lyophilisés pour les extractions d'ADN.

2. Méthodes pour l'analyse de la croissance fongique

Extraction d'ADN. L'ADN fongique a été extrait avec un protocole d'extraction au Sarkosyl (Annexe 2). L'ADN total a ensuite été quantifié en dosage fluorimétrique (Quantifluor One dsDNA kit, Promega, Madison, USA) puis la qualité a été vérifiée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. L'ADN total a été standardisé à une concentration finale de 10 ng.µL⁻¹.

Quantification de l'ADN par PCR quantitative. L'ADN de *F. graminearum* et *F. poae* respectivement a été quantifié dans les cocultures par qPCR ciblant le gène EF1α grâce à des amorces et à des sondes TaqMan, spécifiques à chaque espèce (Tableau 2). Chaque réaction de qPCR contenait 5 µL de PrimeTime™ Gene Expression Master Mix 2X (IDT), 0.3 µL de chaque amorce à 10 µM, 0.1 µL de sonde à 10 µM et 3.3 µL d'eau nuclease free pour 1µL d'ADN génomique à 10 ng.µL⁻¹. Les amplifications ont été réalisées sur le QuantStudio5™ (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finlande) selon le programme suivant : une étape de dénaturation de 3 min à 95 °C ; suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s et d'élongation pendant 30 s à 66 °C ou 64 °C pour *F. graminearum* et *F. poae*, respectivement. Toutes les réactions ont été réalisées en triplica. La quantification a été réalisée à l'aide de courbes d'étalonnage externes avec des solutions standards d'ADN de *F. graminearum*, *F. poae*, respectivement extraits à partir de cultures pures. La proportion d'ADN de chaque espèce dans les cocultures a été calculée comme la quantité de l'espèce concernée sur la somme des quantités des deux espèces en coculture.

Tableau 2 : Couples d'amorces et sondes Taqman utilisés pour la quantification d'ADN fongique par qPCR. Le T_m indique la température d'hybridation spécifique à chaque espèce.

Espèce	Amorce	Séquence 5'-3'	Sonde	Séquence 5'-3'	T _m
<i>F. graminearum</i>	EF1-FCFG_F	TCGATACGCGCCTGTTACC	Probe_Fgrami_Ef1alpha-FAM	/56-FAM/AGCCCCACCC/ZEN/GGGAAAAAATTACGACA/3IABkFQ/	66°C
	EF1-FG_R	ATGAGCGCCCAGGGAATG			
<i>F. poae</i>	EF1-FP2_F	CTCGAGCGATTGCATTTCTTT	Probe_Fpoae_Ef1alpha-FAM	/56-FAM/CGCGAATCG/TAO/TCACGTGTCAATCAGTT/3IAbRQSp/	64°C
	EF1_FP2_R	GGCTTCCTATTGACAGGTGGTT			

3. Méthodes pour l'analyse des mycotoxines

Extraction des mycotoxines. Les surnageants lyophilisés ont été pesés puis repris dans du méthanol (1 :10 ; m/v) avec trois étapes de 5 min à 20 °C dans un bain à ultrasons. Les extraits ont été centrifugés 20 minutes à 4 800 g puis les surnageants ont été conservés à 4 °C avant d'être évaporés au SpeedVac Concentrator SPD210 (Asheville, USA) à 55 °C. Les extraits évaporés ont été lyophilisés et pesés.

Métabolomique non ciblée basée sur l'identification par chromatographie liquide et spectrométrie de masse à haute résolution. Les échantillons ont été mis en suspension dans un mélange méthanol/eau (70:30, v/v) acidifié avec de l'acide formique (0,1 %) jusqu'à une concentration finale de 50 mg.mL⁻¹ d'extrait, pour chaque échantillon. La suspension a été soniquée pendant 20 minutes et filtrée sur un filtre de 0,2 µm dans des flacons HPLC. Le système chromatographique utilisé était une UPLC Class I (Waters, Milford, MA, USA) couplée à un spectromètre de masse Synapt HDMi. La chromatographie a été réalisée sur une colonne Acquity BEH (1.7 µm, 2.1 x 50 mm ; Waters, Milford, Massachusetts, USA) maintenue à 40 °C. Les échantillons ont été maintenus à 15 °C. La phase mobile était composée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), tous deux avec 0,1 % d'acide formique (SIGMA). Les conditions de gradient des phases mobiles étaient les suivantes : 0-20 min gradient linéaire 1-99 % de B, 20-24 min 99 % de B isocratique, 24-25 min gradient linéaire 90-1 % de B (durée totale 30 min). Le débit était de 0,3 mL.min⁻¹ et 5 µL d'extrait ont été injectés. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée avec une source d'ionisation électrospray en mode négatif et positif avec un capillaire, un cône d'échantillonnage et des tensions de décalage de la source de 3 000, 40 et 80 V, respectivement. La température de la source était de 120 °C et la température de désolvatation de 20 °C. Le débit de gaz de désolvatation était de 600 L.h⁻¹ et la pression du nébuliseur de 6,5 bars. La leucine-enképhaline a été utilisée comme composé d'étalonnage interne (*m/z* 556,2771, [M+H]⁺ ; *m/z* 554,2615, [M-H]⁻). Les conditions utilisées pour l'analyse par spectrométrie de masse étaient les suivantes : plage de masse 50-1200 Da, fonction 1 CE, 6 V, fonction 2 CER 10-30 V, temps de balayage 0,5 s. Les données ont été acquises et traitées avec les logiciels MassLynx (version 4.1) et MarkerLynx (version 4.1).

4. Analyses statistiques

Les données de quantification d'ADN ont été exprimées en proportion. La significativité des résultats a été vérifiée par une ANOVA suivie d'un test *post hoc* de Tukey (*p-value* < 0.05). La plateforme bio-informatique MetaboAnalyst 5.0 (Ste. Anne de Bellevue, QC, Canada) a été utilisée pour les analyses statistiques et la représentation des données de métabolomiques sous forme de heatmap et d'Analyse en Composantes Principales (ACP). Les diagrammes de Venn ont été réalisés sur la plateforme Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Résultats et discussion

1. Croissance de la coculture

La Figure 1 représente les quantités d'ADN de *F. graminearum* (I156) et *F. poae* (I72) dans la coculture à 25 °C et 30 °C.

De façon générale, l'ADN de *F. graminearum* était majoritaire dans les cocultures à 25°C et à 30°C. En effet, à 25°C, la quantité d'ADN de *F. graminearum* (95%) était significativement supérieure à celle de *F. poae* (5% ; p -value < 0.05). A 30 °C, la même tendance a été observée avec 66 % de *F. graminearum* contre 34 % de *F. poae*, mais la différence n'était pas significative (p -value > 0.05).

À 30 °C, les quantités d'ADN de *F. graminearum* ont significativement diminué (p -value < 0.05) tandis que celles de *F. poae* ont significativement augmenté (p -value > 0.05). Nos données suggèrent que l'augmentation de la température serait plus favorable à la croissance de *F. poae*, comme nous l'avons également observé dans les parties 1 et 2.1 de ce chapitre. Ces résultats concordent avec une étude ayant démontré une augmentation de la croissance de *F. poae* en coculture avec *F. graminearum* sur le blé (Tan et al., 2020). Toutefois, cette même étude ne s'est pas intéressée aux variations de température.

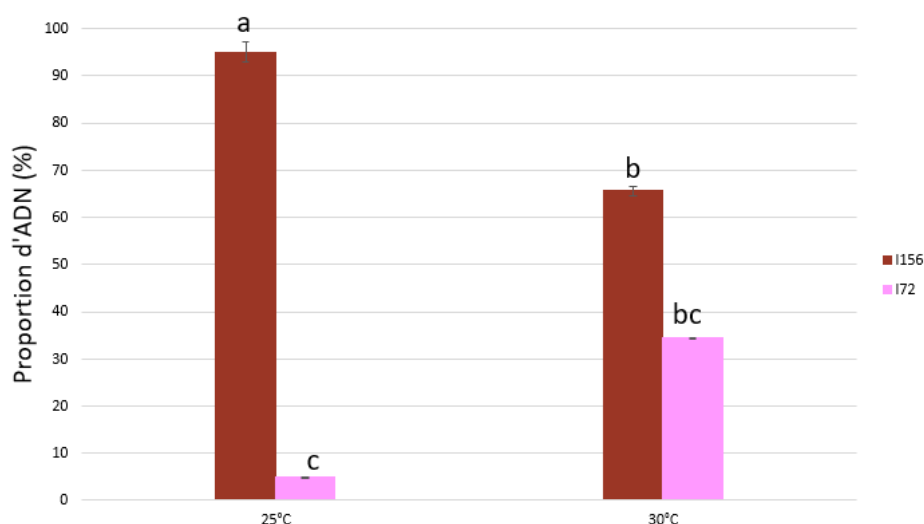


Figure 1 : Quantités d'ADN de *F. graminearum* et *F. poae* en coculture sous différentes conditions thermiques. Les proportions d'ADN (axe des ordonnées) ont été calculées en fonction de la quantité d'ADN total, pour chaque température (axe des abscisses). Les lettres indiquent les différences significatives entre les proportions (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0.05$).

De plus, nos travaux suggèrent que *F. graminearum* serait plus compétitif que *F. poae*, spécifiquement à 25°C. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Khanal et al. (2024) qui ont montré une quantité plus importante d'ADN de *F. graminearum* par rapport à *F. poae* en condition de co-infection sur orge.

2. Profils métabolomiques à 25 °C

La Figure 2 présente la heatmap et les analyses HCA (pour « Hierarchical Cluster Analysis ») associées entre tous les couples masse/charge (R_t , m/z) identifiés de manière différentielle pour les monocultures (I156 et I72) et la coculture (I156/I72) à 25 °C. Nous avons mis en évidence des profils métabolomiques distincts pour *F. graminearum* et *F. poae* en monoculture ainsi que pour la coculture. En effet des signaux m/z spécifiques à la coculture ont été identifiés. D'autre part, certains signaux m/z partagés entre *F. graminearum* et *F. poae* en monoculture ont été observés. De même, nous avons identifié quelques signaux m/z partagés entre les profils métabolomiques de la coculture et de *F. graminearum* en monoculture. Une étude récente s'est intéressée aux profils métabolomiques de *F. graminearum* et *F. poae* en coculture sur épis d'orge et ont également mis en évidence des signaux partagés, ou non, entre la coculture et les espèces en monoculture (Khanal et al., 2024).

Nos résultats suggèrent que le profil métabolomique de la coculture était plus proche de celui de *F. graminearum* que de celui de *F. poae*, respectivement en monoculture. Ces résultats ne concordent pas avec les travaux de Khanal et al. (2024) mais il faut tenir compte du fait que leur étude a été réalisée *in planta*, contrairement à la nôtre, et que les souches étudiées étaient différentes. La présence de signaux propres à chaque échantillon pourrait traduire les caractéristiques écophysiologiques, propres à chaque espèce fusarienne ou à la coculture, en conditions environnementales changeantes.

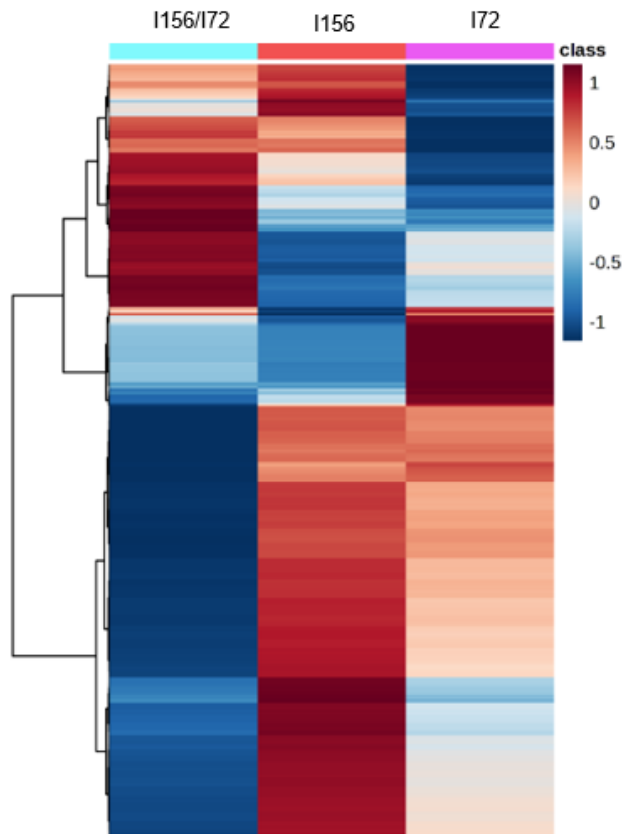


Figure 2 : Heatmap (distance euclidienne et algorithme de Ward) des différents signaux m/z identifiés dans les échantillons à 25 °C. Les signaux m/z des trois réplicas des monocultures (1156 pour *F. graminearum* et 172 pour *F. poae*) et de la coculture (1156/172) ont été regroupés et sont représentés en colonne. Chaque ligne correspond à un signal m/z , c'est-à-dire à une molécule. Plus la couleur tend vers le bleu foncé, moins la molécule est retrouvée dans l'échantillon concerné. Au contraire, plus la couleur tend vers le rouge, plus la molécule est identifiée dans l'échantillon. En haut du graphique, les échantillons ont été regroupés par similarité des signaux m/z identifiés. Sur le côté gauche du graphique, les signaux m/z ont été regroupés en fonction de leur présence dans les échantillons.

Les 1 153 couples (R_t , m/z) partagés entre les échantillons ont été représentés sur la Figure 3. De façon générale, nous avons observé le plus de signaux m/z pour les profils métabolomiques obtenus à 25 °C, avec un minimum de 80 signaux m/z identifiés chez *F. poae* en monoculture. Les profils métabolomiques de *F. graminearum* en monoculture et de la coculture présentaient le plus de signaux m/z avec 634 et 115 signaux, respectivement. De plus, nous avons mis en évidence qu'à 25 °C, la coculture partageait plus de molécules avec *F. graminearum* en monoculture (240 signaux m/z) qu'avec *F. poae* (8 signaux m/z ; Figure 3).

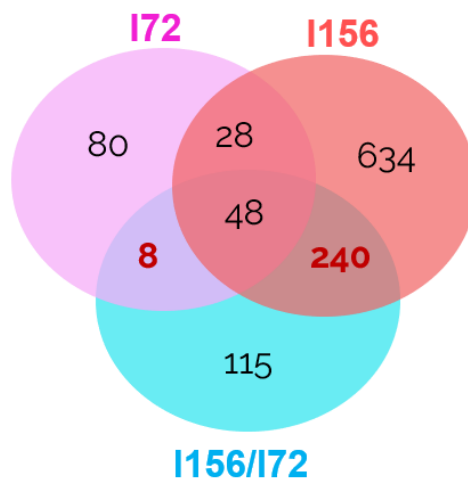


Figure 3 : Diagramme de Venn représentant le nombre exact de signaux m/z partagés entre les échantillons des monocultures (*F. graminearum* I156 et *F. poae* I72) et de la coculture (I156/I72) à 25 °C. Le nombre de rapport m/z a été calculé en moyennant les valeurs obtenues pour chaque réplica du même échantillon. Le nombre de signaux m/z partagés entre la coculture et la monoculture de *F. graminearum* et *F. poae* respectivement est mis en évidence en rouge et en gras.

3. Profils métabolomiques à 30 °C

La Figure 4 présente la heatmap et les analyses HCA associées entre tous les couples masse/charge (R_t , m/z) identifiés de manière différentielle pour les monocultures (I156 et I72) et la coculture (I156/I72) à 30 °C. Nous avons mis en évidence des profils métabolomiques distincts pour *F. graminearum* et *F. poae* en monoculture ainsi que pour la coculture. Nos résultats suggèrent tout de même que le profil métabolomique de la coculture et celui de *F. poae* étaient plus proches entre eux qu'avec celui de *F. graminearum* en monoculture à 30 °C.

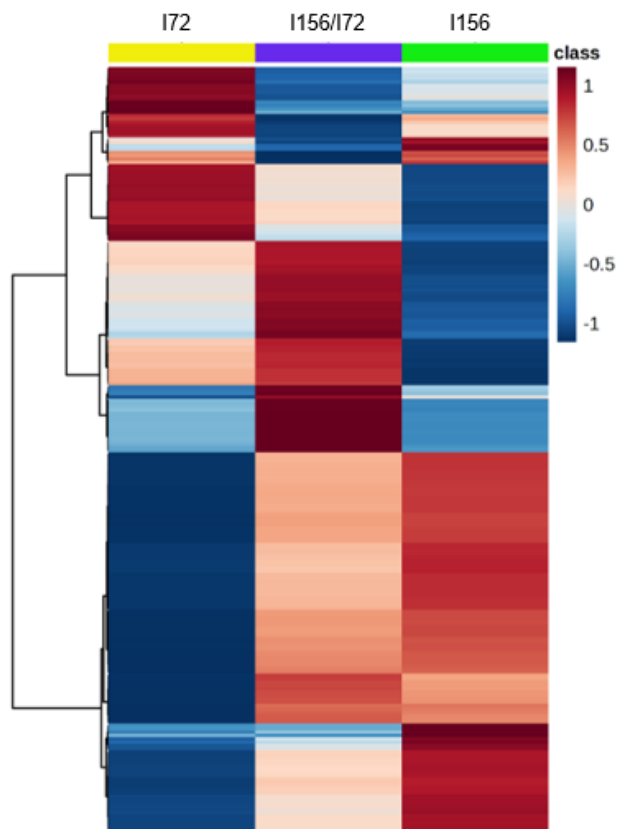


Figure 4 : Heatmap (distance euclidienne et algorithme de Ward) des différents signaux m/z identifiées dans les échantillons à 30 °C. Les signaux m/z des trois réplicas des monocultures (I156 pour *F. graminearum* et I72 pour *F. poae*) et de la coculture (I156/I72) ont été regroupés et sont représentés en colonne. Chaque ligne correspond à un signal m/z , c'est-à-dire à une molécule. Plus la couleur tend vers le bleu foncé, moins la molécule est retrouvée dans l'échantillon concerné. Au contraire, plus la couleur tend vers le rouge, plus la molécule est identifiée dans l'échantillon. En haut du graphique, les échantillons ont été regroupés par similarité des signaux m/z identifiés. Sur le côté gauche du graphique, les signaux m/z ont été regroupés en fonction de leur présence dans les échantillons.

Les 229 couples (R_t , m/z) partagés entre les échantillons ont été représentés sur la Figure 5. De façon générale, nous avons observé que les profils métabolomiques obtenus à 30 °C présentaient peu de signaux m/z , avec un maximum de 108 identifiés chez *F. graminearum* en monoculture. Les profils métabolomiques de *F. poae* en monoculture et de la coculture étant les moins riches en molécules avec 23 et 13 signaux m/z , respectivement. Nous avons tout de même confirmé nos précédents résultats en mettant en évidence qu'à 30 °C, la coculture partageait plus de molécules avec *F. poae* en monoculture (23 signaux m/z) qu'avec *F. graminearum* (1 signal m/z).

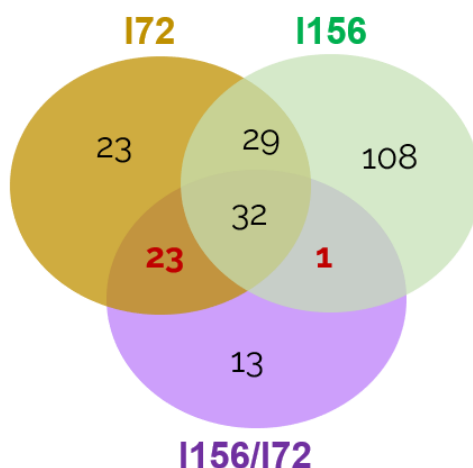


Figure 5 : Diagramme de Venn représentant le nombre exact de signaux m/z partagés entre les échantillons des monocultures (*F. graminearum* I156 et *F. poae* I72) et de la coculture (I156/I72) à 30 °C. Le nombre de rapport m/z a été calculé en moyennant les valeurs obtenues pour chaque réplique du même échantillon. Le nombre de signaux m/z partagés entre la coculture et la monoculture de *F. graminearum* et *F. poae* respectivement est mis en évidence en rouge et en gras.

4. Comparaison des profils métabolomiques des monocultures et de la coculture à 25 °C et 30 °C

Les données des couples (R_t , m/z) pour les monocultures et les cocultures à 25 °C et 30 °C ont été combinées au sein d'une ACP présentée sur la Figure 6. Le premier et le second axe représentent 47.2 % et 24.7 % de la variance, respectivement. Nous pouvons d'abord noter la répétabilité de nos répliques. De plus, nous avons pu mettre en évidence deux regroupements d'échantillons : le profil métabolomique de la coculture à 25 °C a été regroupé avec celui de la monoculture de *F. graminearum* à 25 °C (cercle vert sur la Figure 6). De même, le profil métabolomique de la coculture à 30 °C a été observé comme plus proche de celui de la monoculture de *F. poae* à 30 °C (cercle rouge sur la Figure 6). Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de la température, favorable au développement de *F. poae*, comme nous l'avons démontré par l'étude de sa croissance en monoculture dans la partie 1 de ce chapitre. La littérature ayant également largement documenté, par des études *in vitro*, *in planta* ou au champ, que les climats chauds et secs étaient favorables au développement de *F. poae* (Boutigny et al., 2019; Cobo-Díaz et al., 2019a; Kokkonen et al., 2010; Van Der Lee et al., 2015; Banik et al., 2018; Nogueira et al., 2018; Valverde-Bogantes et al., 2020). Nos observations concernant les quantités d'ADN confirment également cette hypothèse, justifiant le comportement de la coculture plus proche à celui de *F. poae* à 30 °C.

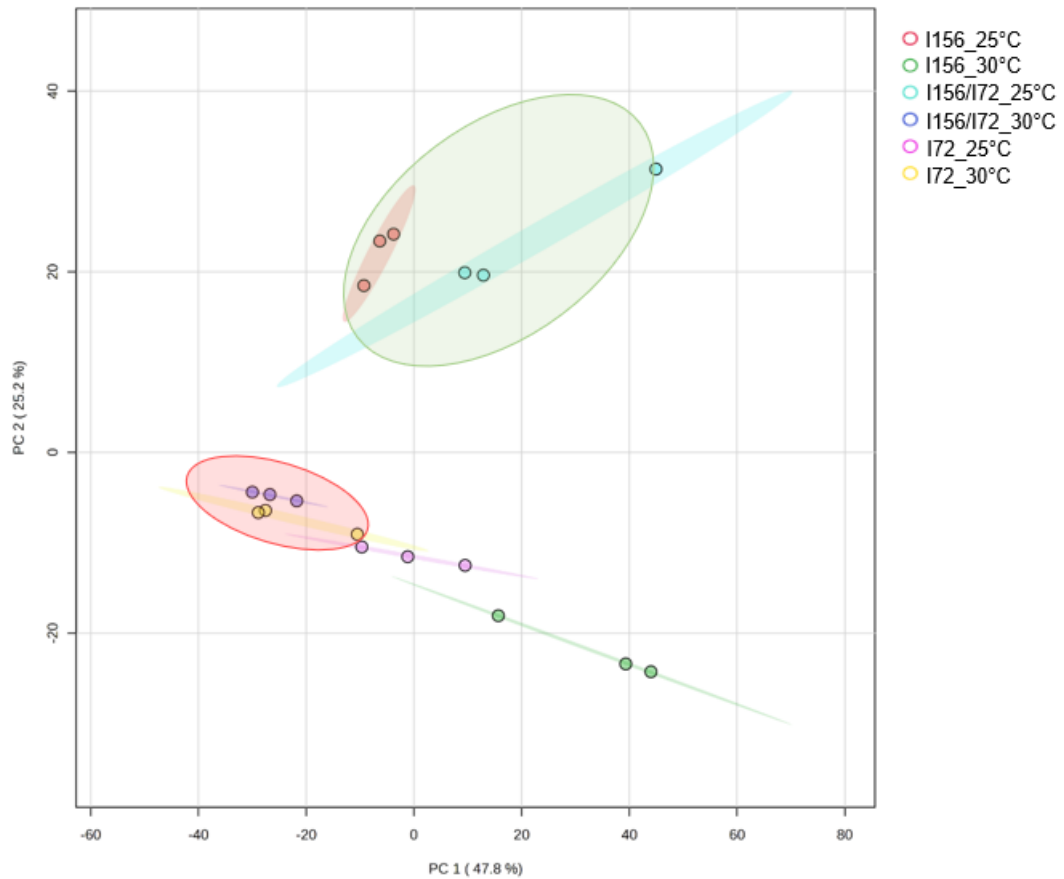


Figure 6 : Analyse en composantes principales des signaux m/z identifiés dans les échantillons des monocultures (*F. graminearum* I156 et *F. poae* I72) et de la coculture (I156/I72) à 25°C et à 30°C. Chaque point représente un réplica technique. Le cercle vert représente le groupement de la monoculture de *F. graminearum* et de la coculture à 25°C. Le cercle rouge représente le groupement de la monoculture de *F. poae* et de la coculture à 30°C.

Résumé des conclusions

Quantification d'ADN :

- *F. graminearum* prédominant à 25°C et à 30°C mais
 - diminution de *F. graminearum* à 30°C
 - augmentation de *F. poae* à 30°C

Profils métabolomiques :

- Coculture à 25°C proche de *F. graminearum*
- Coculture à 30°C proche de *F. poae*

Conclusions et perspectives du chapitre 2

Pour conclure ce chapitre, nous chercherons à établir un lien entre nos résultats observés en monoculture (partie 1 du chapitre 2) et en coculture (partie 2 du chapitre 2), afin de répondre à la question : **quelles sont les réponses des espèces fusariennes face à différentes pressions abiotiques ?**

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence différentes caractéristiques écophysiological propres à chaque espèce fusarienne, en réponse aux changements environnementaux. Nous avons également soulevé toute la complexité de l'étude des espèces en coculture. En effet, nos connaissances actuelles sur les mécanismes mis en place par les différentes espèces de *Fusarium*, à l'échelle de la relation intraspécifique, ou de la plante, sont très limitées.

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons mis en évidence que la croissance de *F. graminearum* était favorisée par des conditions moyennement chaudes et plutôt humides. Au contraire, *F. avenaceum* était favorisé par des conditions plus fraîches tandis qu'un environnement chaud et sec était plus propice au développement de *F. poae*. Les cocultures traitées dans la deuxième partie de ce chapitre ont mis en évidence un effet de la température sur le développement de *F. graminearum* et un effet de l' a_w sur *F. avenaceum* et *F. poae*. Nos résultats concordent bien entre les monocultures et les cocultures. Il semblerait que les espèces en monoculture et en coculture présentent des réponses similaires, en termes de croissance, face aux changements environnementaux.

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence des différences de production de mycotoxines entre les monocultures et les cocultures en réponse aux variations des conditions environnementales.

En effet, en coculture, seul le DAS a été détecté alors qu'en monoculture *F. poae* a été capable de produire un plus large panel de mycotoxines (DAS, T-2, ENNB, ENNB1 et FX). Au contraire, les profils de mycotoxines de *F. graminearum* et *F. avenaceum* sont restés inchangés entre les monocultures et les cocultures (DON + ADON et ENN, respectivement).

De plus, *F. avenaceum* et *F. poae* en monoculture ont produit nettement plus de mycotoxines qu'en coculture avec *F. graminearum*, quelles que soient les conditions environnementales. Par exemple, à 25 °C et à l' $a_w = 0.99$, la concentration d'ENN était de 12 062 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour *F. avenaceum* en monoculture contre 444 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en coculture avec *F. graminearum*. De même, une diminution de la production de DON + ADON a été observée dans la coculture FG/FA, en comparaison avec la monoculture de *F. graminearum*, quelle que soit la condition environnementale. Ces résultats suggèrent une tendance à la diminution de la production de mycotoxines par les espèces en coculture. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Simpson et al. (2004), ayant mis en évidence la diminution de la production de DON par *F. culmorum* en coculture *in vitro* avec *Microdochium majus*.

Toutefois, nous avons mis en évidence un comportement spécifique à la coculture FG/FP. En effet, nettement plus de DON + ADON a été quantifié dans la coculture à 25 °C et à l' $a_w = 0.99$, en comparaison avec la monoculture de *F. graminearum* dans ces mêmes conditions (37 085 contre 11 293 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement). Ces résultats suggèrent un potentiel effet du DON + ADON, produit par *F. graminearum*, dans la compétition avec *F. poae*.

Ces résultats soulèvent l'hypothèse d'un potentiel rôle des mycotoxines dans la compétition entre les espèces pour la ressource ou l'espace. Cependant, les connaissances concernant le rôle des mycotoxines fusariennes dans les interactions interspécifiques (compétition pour l'espace, pour les ressources, pour la colonisation, pour la reproduction) restent très peu documentées à ce jour.

L'étude des profils métabolomiques de la coculture FG/FP nous a permis de conclure sur l'effet de la température sur la croissance et la production de métabolites. Ces travaux *in vitro* appuient l'hypothèse que *F. poae* pourrait devenir une espèce prédominante associée à la FHB, en réponse au réchauffement climatique (Banik et al., 2018; Nogueira et al., 2018; Boutigny et al., 2019; Valverde-Bogantes et al., 2020).

Une perspective à ces travaux serait d'étudier et de parvenir à l'identification des différents métabolites produits par les monocultures et les cocultures sous différentes conditions environnementales. Ces travaux nous permettraient d'identifier d'une part les potentielles molécules impliquées dans la réponse spécifique à chaque espèce aux

variations environnementales. D'autre part, nous pourrions également identifier de potentielles molécules spécifiquement impliquées dans les réponses à la compétition interspécifique.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Bilan des travaux de thèse

Les travaux de cette thèse portaient sur le potentiel adaptatif des espèces fusariennes toxigènes face aux changements climatiques, que nous avons étudié via la représentativité des espèces fusariennes et des profils de mycotoxines associées au champ ainsi que via les caractéristiques écophysiologiques de certaines espèces en monoculture et en coculture.

Ces travaux de thèse constituent une importante source de données qui apporteront des éléments clés dans l'approfondissement de la compréhension de la FHB.

Plus de 1 200 échantillons de blés récoltés sur tout le territoire français entre 2007 et 2022 ont été traités par une approche de métabarcoding ciblée. La composition des communautés fusariennes et des mycotoxines associées a été étudiée à la lumière de différents facteurs environnementaux, soulevant la complexité des interactions entre les espèces, les mycotoxines et le climat.

Nos travaux ont mis en évidence que, sur les 15 dernières, les espèces fusariennes majoritaires identifiées au champ étaient identiques, avec des différences de distribution en fonction des années et des conditions climatiques. Nous avons conclu que *F. graminearum* et *F. poae* étaient les deux espèces prédominantes, suivies par *F. langsethiae*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum* et *F. culmorum*. Nous avons également mis en évidence une forte relation négative entre *F. graminearum* et *F. poae*, confirmant leur appartenance à deux niches écologiques différentes.

Les mycotoxines les plus présentes sur nos échantillons de blé étaient le DON + ADON, le NIV et les ENN. Enfin, nous avons mis en évidence de faibles mais significatives corrélations entre la température mesurée au champ durant les 7 jours autour de la floraison et certaines mycotoxines (corrélation positive avec le DON + ADON et négative avec la ZEA et les TCTA).

Les caractéristiques écophysiologiques des espèces majoritaires identifiées au champ en France ont été étudiées afin de mettre en évidence des différences de comportement des espèces fusariennes en réponse à des variations environnementales. C'est la première fois que 25 géotypes, issus de cinq souches

différentes pour cinq espèces de *Fusarium*, ont été simultanément étudiés en condition *in vitro*.

De façon générale, nous avons identifié des caractéristiques écophysiological propres à chaque espèce, en réponse aux changements des conditions de culture.

L'étude des monocultures nous a permis de mettre en évidence l'impact de la diversité intraspécifique et interspécifique des champignons du genre *Fusarium* sur la croissance et la production de mycotoxines, en réponse à des variations de température et d'activité de l'eau. Nous avons également pu conclure que, dans nos conditions de culture, *F. poae* est une espèce plus favorisée par des températures hautes (25-30 °C) contrairement à *F. langsethiae* plus propice au développement à des températures basses (15-20 °C). De même, nous avons observé que globalement, les modifications d' a_w dans le milieu de culture induisent la diminution de la production de mycotoxines par les espèces fusariennes tandis que les variations de température impactent différemment les TCTB ou les ENN (augmentation de la production), en comparaison avec les TCTA (diminution de la production).

L'étude des espèces en coculture a permis de mettre en évidence la complexité des comportements des espèces, en termes de croissance, production de mycotoxines et composition des profils métaboliques, en réponse à des variations environnementales. De façon générale, nous avons pu conclure à différents comportements des espèces en réponse aux variations environnementales ainsi qu'à la diversité intraspécifique propre à *F. graminearum*. En effet, nous avons observé que les quantités d'ADN de *F. graminearum* étaient plus impactées par la température, contrairement à celles de *F. avenaceum* ou *F. poae*, plus significativement impactées par l' a_w . Au contraire, la production de mycotoxines par *F. poae* a été significativement impactée par la température, tout comme les mycotoxines produites par *F. graminearum*, également impactées par l' a_w . Enfin, l'augmentation de la température semble avoir été plus propice au développement de *F. poae* dans la coculture avec *F. graminearum*, le profil métabolomique de la coculture à 30 °C étant plus proche de celui de *F. poae* en monoculture à la même température.

Dans l'analyse de ces résultats, nous avons constaté certaines incohérences entre les données observées au champ et les données obtenues en culture *in vitro*.

Par exemple, nos études *in vitro* ont suggéré un environnement frais favorable au développement de *F. langsethiae* alors que cette même espèce était prédominante au

champ en 2022, année la plus chaude et la plus sèche, au moment de la floraison, depuis 15 ans. Nous avons également mis en évidence différents effets de la température et de l' a_w sur les productions de mycotoxines par les différentes espèces *in vitro* alors que seulement de faibles corrélations ont pu être mises en évidence entre la température et la distribution de certaines mycotoxines au champ. De plus, les études des cocultures semblent mettre en évidence une compétitivité accrue de *F. poae* sur *F. graminearum* alors que les études au champ montrent généralement une prédominance de *F. graminearum*.

Ces incohérences peuvent s'expliquer par le fait que de nombreux facteurs environnementaux ne peuvent pas être pris en compte dans les études *in vitro*, ce qui limite nos interprétations en comparaison avec les observations au champ.

En effet, au sein du triangle de pathogénicité, trois acteurs sont impliqués dans la FHB : le complexe plante/pathogène (blé/*Fusarium*), le système de culture et les facteurs climatiques. Ces trois acteurs sont en constante relation et de nombreux facteurs peuvent agir, aux trois niveaux, rendant l'étude de la FHB complexe car en constante évolution.

Je profiterai de cette discussion générale pour approfondir les résultats soulevés dans ces travaux de thèse. La Figure 1, concluant cette discussion générale (page 182) récapitulera les grandes conclusions mises en évidence dans ce manuscrit et fera un état des lieux des connaissances actuelles et des leviers à étudier pour mieux comprendre la FHB.

Exploiter d'autres paramètres de l'agrosystème pour mieux comprendre les distributions fusariennes

A l'échelle du système de culture, nos travaux ont permis de mettre en évidence l'effet de l'année, de la plante hôte, de la température et de la pluviométrie sur la distribution des espèces fusariennes et des mycotoxines associées (Figure 1.A).

De nombreux facteurs environnementaux, climatiques et agronomiques ont déjà été reconnus comme affectant significativement la distribution des espèces fusariennes et des mycotoxines (Leplat et al., 2013; Vaughan et al., 2016; Edwards & Jennings, 2018; Vogelgsang et al., 2019). L'importante base de données dont nous disposons nous permettra d'étudier l'effet d'un plus large panel de facteurs via différentes méthodes.

Dans les prochains paragraphes, je m'attacherai à proposer des études complémentaires à ces travaux de thèse, envisageables grâce à la base de données disponible. La significativité de l'effet des différents facteurs sur la distribution des espèces fusariennes et des profils de mycotoxines associées pourra être étudiée dans un premier temps. Dans un second temps, des analyses à multiples facteurs seront envisageables afin d'établir les différentes corrélations entre les facteurs environnementaux, les espèces et les mycotoxines.

1. Étudier la localisation

Pour chaque échantillon, le site de récolte a été renseigné, ce qui pourra nous permettre d'étudier la distribution spatiale des espèces fusariennes et des mycotoxines associées, sur le territoire français (Figure 1.B). Ceci pourra être mis en œuvre via une étude par cartographie, comme cela a été fait par Infantino et al. (2023). Ces auteurs ont étudié la distribution, sur le blé, des principales espèces fusariennes en Italie. Les sites géographiques italiens présentant des conditions climatiques plus spécifiquement favorables au développement préférentiel de *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae* ou *F. sporotrichioides* ont ainsi été mis en évidence, confirmant les caractéristiques écophysiologiques propres à chaque espèce.

2. Étudier les méthodes de culture au champ

Il a largement été documenté que le risque de la FHB, lié à la contamination par *F. graminearum*, augmente si le maïs a précédé la culture de blé, d'autant plus si l'enfouissement des résidus n'est pas pratiqué (Dill-Macky & Jones, 2000; Holland, 2004; Edwards & Jennings, 2018; Vogelgsang et al., 2019). En effet, *F. graminearum* présente une phase saprophyte dans son cycle de vie et se conserve donc dans le sol et les résidus de culture. Les facteurs agronomiques qui modifient la structure du sol, et donc le réservoir d'inoculum primaire de *F. graminearum*, ont donc un impact sur le développement de la FHB (Leplat et al., 2013; Vaughan et al., 2016). La base de données dont nous disposons nous permettra d'étudier l'effet du travail du sol et du précédent cultural sur la distribution des espèces fusariennes majoritairement identifiées au champ sur 15 dernières années (Figure 1.B).

Les connaissances concernant le cycle de vie des autres espèces fusariennes sont limitées, ce qui représente aujourd'hui un levier indispensable pour une meilleure compréhension de la FHB (Figure 1.C). Chez *F. graminearum*, il a été mis en évidence que les périthèces constituent les formes de conservation de l'inoculum primaire et sont le lieu de production des ascospores, spores sexuées assurant la dissémination de la maladie. Inch and Gilbert, (2003) ont montré que les ascospores ne sont produites qu'en surface du sol, contrairement aux périthèces pouvant être enfouies jusqu'à une dizaine de centimètres. De plus, des études *in vitro* ont mis en évidence que l'exposition de mycéliums aux rayonnements UV altère la capacité de germination des conidies chez *F. culmorum* (Pál et al., 2005). La survie des ascospores en surface du sol pourrait ainsi être impactée par des périodes de fort ensoleillement.

3. Étudier le rayonnement

Le niveau d'ensoleillement peut être estimé par la mesure de la quantité d'énergie quotidiennement produite par le rayonnement solaire.

Comme nous venons de le montrer, l'étude du rayonnement pourrait être un levier dans la compréhension de la distribution des espèces fusariennes au champ (Figure 1.D). À notre connaissance, ceci n'a encore jamais été réalisé. Notre base de données disposant de ces informations, nous pourrions étudier le potentiel effet de ce facteur, aux différents stades phénologiques de la plante et donc aux différents stades de

développement fongique. Ces potentiels résultats demanderont des études approfondies afin de comprendre s'il existe des réponses différentes à l'échelle interspécifique et si le rayonnement agit au niveau des spores ou au niveau du développement fongique. Pour ce faire, il serait envisageable de s'intéresser à des échantillons de sols et de feuilles, afin d'identifier de potentiels effets différentiels du rayonnement sur la composition de la communauté fusariennes dans ces matrices.

4. Étudier l'impact de la phénologie de l'interaction blé/*Fusarium*

Concernant les facteurs climatiques tels que le rayonnement, la pluviométrie et la température, nous disposons de données à différentes dates, correspondant à différents stades phénologiques de la plante (Figure 1.B). Ceci pourra nous permettre de conclure sur différents effets des facteurs climatiques sur la distribution des espèces fusariennes, en fonction de la phénologie de la plante mais aussi des espèces de *Fusarium*. À ce jour, la notion de phénologie fongique n'est que très peu documentée. Selon Delmas et al. (2024), elle fait référence aux processus d'interactions entre les champignons phytopathogènes, leurs hôtes et leur environnement, se produisant au cours du cycle de développement fongique. Ces mêmes auteurs ont établi un système de notation commun aux phytopathogènes fongiques, permettant de déterminer les caractères, telles que la production et la germination de spores, la croissance mycélienne, la reproduction ou encore la survie, définissant leur phénologie (Delmas et al., 2024). Bottalico and Perrone, (2002) ont effectivement mis en évidence l'interaction entre la phénologie du blé et celle de *F. culmorum*, son développement étant favorisé par un climat chaud et humide au moment de la floraison. Par exemple, l'étude de l'occurrence des espèces fusariennes lors de la phase hivernale pourrait apporter des résultats clés dans la compréhension de l'effet des températures froides sur la production d'inoculum primaire, conditionnant le risque FHB de la culture suivante (Figure 1.C).

Notre base de données présente également des informations concernant les variétés de blés cultivées (Figure 1.B), ce qui nous permettra d'apporter des précisions sur d'éventuelles spécificités de sensibilité variétale en fonction des espèces fusariennes prédominantes. Ces potentiels résultats s'avèreraient utiles dans les projets de recherches sur la sélection variétale (Leslie et al., 2021).

De plus, nous pourrions nous intéresser aux potentielles différences de contamination en fonction de la phénologie de la plante, grâce aux dates de semis, d'épiaison, de floraison et de récolte, renseignées dans la base de données (Figure 1.B).

Enfin, des facteurs plus techniques tels que l'irrigation ou l'application de fongicides (Figure 1.B), pourraient être étudiés afin de tenir compte d'un maximum d'éléments variables pouvant affecter la distribution des espèces et des profils de mycotoxines au champ.

La fusariose : un modèle d'étude de maladie multi-pathogène

1. Vers une meilleure compréhension des communautés de *Fusarium* impliquées dans la fusariose de l'épi

A l'échelle des espèces fusariennes, l'étude de métabarcoding nous a permis de déterminer de façon semi-quantitative la composition des communautés au rang de l'espèce (Figure 1.E). Une approche courante est de compléter ces données avec des mesures quantitatives absolues obtenues par qPCR (Falentin et al., 2019), la corrélation entre l'abondance relative et les quantités d'ADN ayant déjà été mise en évidence dans la littérature (Karlsson et al., 2016; Boutigny et al., 2019; Nguyen et al., 2024). L'étude des données de qPCR sera la prochaine étape à mettre en œuvre dans la continuité de nos travaux afin de confirmer la présence des espèces identifiées par métabarcoding puis de traiter plus spécifiquement certaines relations entre les espèces, les mycotoxines et les facteurs environnementaux (Figure 1.F). Aussi, cela nous permettra de disposer de données quantitatives, plus adaptées pour les analyses multivariées et les corrélations.

2. Les mycotoxines : profils complexes et profils cachés

Dans ces travaux de thèse, nous avons été confrontés à certaines incompréhensions, notamment concernant l'analyse des mycotoxines.

D'une part, nous avons mis en évidence une tendance générale à la présence des mêmes profils de mycotoxines, peu importe l'année ou les espèces fusariennes prédominantes (Figure 1.E). D'autre part, la ZEA a été fortement corrélée avec les TCTA alors que nous nous attendions à observer ce résultat plutôt avec les TCTB, ces mycotoxines étant majoritairement produites par les mêmes espèces fusariennes. Nous avons discuté de la limite de ces résultats due au peu d'échantillons (moins de 6 %) concernés par la présence de ZEA et de TCTA.

Nous pouvons également soulever l'hypothèse que d'autres mycotoxines étaient présentes dans nos échantillons environnementaux mais n'ont pas pu être détectées avec notre méthode d'analyse. En effet, d'autres formes de mycotoxines, aussi appelées « mycotoxines masquées » sont fréquemment détectées dans les céréales

contaminées par *Fusarium*. En effet, les revues de Berthiller et al. (2013) et Angioni et al. (2022) font l'état des lieux des connaissances sur les mycotoxines masquées retrouvées dans les plantes. Ce sont des formes glycosylées, synthétisées par la biotransformation respective du DON et de ses formes acétylées, de la ZEA, du NIV, de la FX ou encore des TCTA (T-2, HT-2, DAS). Cette biotransformation survient après l'activation des mécanismes de défense de la plante, suite à la contamination par les espèces fusariennes. Angioni et al. (2022) se sont alarmés sur le risque d'augmentation de la production de mycotoxines masquées dans les aliments, résultant de l'augmentation du risque de contamination fongique liée aux changements climatiques. Leur étude pourrait être un levier dans la compréhension des relations avec les espèces fusariennes détectées au champ (Figure 1.C), leur production dépendant de différents facteurs environnementaux, biologiques, chimiques et chimico-physiques (Angioni et al., 2022). Ceci pourrait être envisagé par la quantification des mycotoxines masquées via des méthodes de chromatographies telles que HPLC ou LC-MS. Toutefois, Angioni et al. (2022) soulèvent les limites de ces méthodes dans l'identification des mycotoxines masquées, leur quantification pouvant être sous-estimée.

3. Du champ au laboratoire : une appréhension nouvelle de l'appartenance des espèces de *Fusarium* à différentes niches écologiques

Concernant les relations entre les espèces fusariennes au champ, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre *F. poae* et *F. graminearum*, suggérant leur appartenance à des niches écologiques différentes (Figure 1. E), comme l'ont également suggéré Vogelgsang et al. (2019) dans leurs analyses sur échantillons de blés récoltés en 2007-2010 et 2011-2014.

Nous avons confirmé cette hypothèse par l'étude des caractéristiques écophysiologiques *in vitro* de *F. poae* et *F. graminearum* en réponse aux variations environnementales. En effet, nous avons conclu que ces deux espèces présentaient des besoins différents pour leur croissance et leur production de mycotoxine respectives, *F. poae* étant favorisé par des environnements plus chauds et secs que *F. graminearum*, comme cela a pu être largement mis en évidence dans la littérature

(Van Der Lee et al., 2015; Banik et al., 2018; Nogueira et al., 2018; Valverde-Bogantes et al., 2020; Vogelgsang et al., 2019).

Toutefois, nos résultats *in vitro* n'ont pas toujours été en accord avec nos observations au champ. En effet, le comportement *in vitro* spécifique de *F. langsethiae* en conditions plus fraîches (15-20 °C) n'a pas été confirmé par nos analyses de la distribution des espèces au champ, sa présence étant accrue en 2022, année la plus chaude au moment de la floraison sur les 15 dernières années.

Le fait que nos résultats *in vitro* et nos observations au champ ne concordent pas peut s'expliquer par la complexité des interactions à l'échelle environnementale, soulevant l'hypothèse de l'appartenance des espèces fusariennes à différentes niches écologiques (Figure 1. C). En effet, les nombreux facteurs décrits dans les paragraphes précédents de la discussion agissent continuellement sur le complexe blé/*Fusarium* et l'ensemble des interactions qui en découlent ne peuvent pas toujours être reproduites en conditions contrôlées au laboratoire.

4. De l'analyse des comportements des espèces *in vitro* vers l'étude de l'interaction blé/*Fusarium in planta*

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance et la production de mycotoxines des espèces en monoculture et en coculture.

L'une des perspectives de ces travaux serait d'étudier d'autres facteurs environnementaux en conditions contrôlées, qui mimeraient les variations environnementales auxquelles les espèces fusariennes pourraient être confrontées en milieu naturel (Figure 1.C). Par exemple, les variations de pH rencontrées dans le sol ou dans la plante pourraient être mimées *in vitro*, tout comme les différentes sources de carbone disponibles (saccharose, glucose), les variations de lumière et de qualité de l'air ambiant (CO₂) ou encore les variations environnementales sur l'épi de blé, engendrées par la mise en place des mécanismes de défense de la plante (espèces réactives de l'oxygène, ROS ; H₂O₂) pour lutter contre la contamination par les espèces fusariennes. L'impact de ces différents facteurs sur la croissance et la production de TCTB par *F. graminearum* a largement été documenté (Merhej et al., 2011). Globalement, des études *in vitro* ont montré que l'acidification du milieu de

culture (Merhej et al., 2010) ou la présence de sucrose, en comparaison au glucose (Jiao et al., 2008), entraînent une augmentation de la production de TCT par *F. graminearum*. Cependant, à ce jour, les connaissances concernant les autres espèces fusariennes sont encore à approfondir. Dans un premier temps, l'étude des différents facteurs précédemment cités pourrait être menée *in vitro* afin de déterminer les caractéristiques interspécifiques dans les réponses des espèces de *Fusarium*. Dans un second temps, des études *in planta* pourraient être envisagées afin de se rapprocher des conditions réelles propices au développement de la FHB.

5. La communauté synthétique : une nouvelle approche pour étudier les interactions complexes entre les espèces de *Fusarium*

Notre étude des interactions entre *F. graminearum* et *F. avenaceum* ou *F. poae* nous a permis de mettre en évidence des différences de comportement des cocultures, en termes de croissance et de production des mycotoxines, en réponse aux variations de température et d'activité de l'eau. En parallèle, notre étude de métabarcoding nous a permis d'identifier un maximum de 11 espèces fusariennes différentes sur un même échantillon, la littérature précisant que jusqu'à 20 espèces peuvent être en interaction sur le même épi de blé (Arseniuk et al., 1999).

Il serait donc intéressant de traiter des cocultures par exemple par l'étude d'une communauté synthétique, composée de plusieurs espèces de *Fusarium*, afin de mimer les relations complexes qui ont lieu au champ. Cette perspective, via l'étude d'un Méta*Fusarium* composé de 7 espèces différentes, fait l'objet de travaux en cours à MycSA, réalisés dans le cadre du projet TEAMTOX. Le but étant de décrypter la régulation de la biosynthèse des mycotoxines produites par le Méta*Fusarium* (Figure 1. C).

6. La génomique : un outil pour la fine compréhension des interactions entre les espèces de *Fusarium*

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence des différences de production de DON + ADON par *F. graminearum* en coculture avec *F. poae* ou *F. avenaceum* et également en réponse aux modifications des conditions environnementales. Ces

résultats illustrent toute la complexité d'étudier les espèces en interactions (Figure 1. E). Notamment, nous avons soulevé un comportement spécifique à la coculture entre *F. graminearum* et *F. poae*. En effet, nous avons soulevé l'hypothèse d'un potentiel effet du DON + ADON, produit par *F. graminearum*, dans la compétition avec *F. poae*. De plus, nous avons mis en évidence des caractéristiques écophysiological propres à *F. poae* en mono et en coculture, les conditions environnementales chaudes favorisant son développement.

Une perspective de ces travaux serait d'étudier l'effet des variations environnementales, comme l'augmentation de la température, sur l'expression de gènes cibles impliqués dans les voies de biosynthèses des mycotoxines chez les espèces en monoculture et en coculture (Figure 1. C). Par exemple, Ponts et al. (2007) ont mis en évidence l'effet de l'H₂O₂ sur l'expression des gènes *Tri* chez *F. graminearum* cultivé *in vitro*. Ces auteurs ont évalué l'abondance des transcrits de certains gènes du cluster *Tri* par PCR en temps réel.

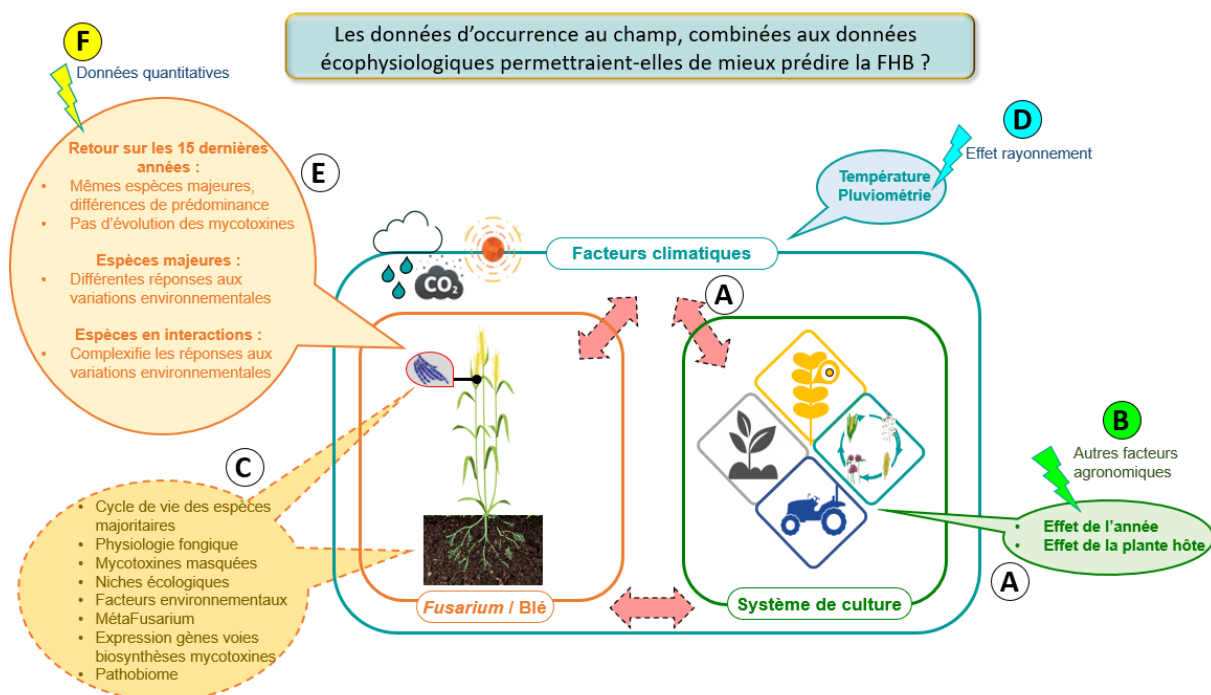


Figure 1 : Schéma récapitulatif des conclusions et leviers identifiés dans ces travaux de thèse dans le but de prédire et anticiper la FHB. Les trois acteurs du triangle de pathogénicité sont représentés, ainsi que les connaissances acquises et à approfondir à leur échelle respective. Les conclusions apportées par ces travaux de thèse sont indiquées dans les bulles en trait plein. Les éclairs indiquent les perspectives à court terme de l'étude. Les leviers à étudier sont indiqués dans la bulle et les flèches en tirets. Les lettres indiquent les références au texte de la discussion générale.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces travaux de thèse ont mis en évidence la complexité des relations entre les espèces fusariennes, les mycotoxines associées et les facteurs environnementaux. Dans le contexte actuel de changement climatique qui nous mène vers un climat globalement plus chaud et humide, le risque lié à la FHB évolue. Les réponses des plantes hôtes et des espèces fusariennes au changement climatique étant étroitement liées, des modifications dans les espèces majoritaires sont susceptibles de survenir dans les prochaines années.

Considérer l'effet du changement climatique sur la globalité du pathobiome d'infection lié à la FHB (Figure 1. C), en tenant compte des co-occurrences sur le blé entre les espèces fusariennes et les autres micro-organismes fongiques ou bactériens est un changement d'échelle indispensable (Karlsson et al., 2021).

Une étude récente s'est intéressée à la co-occurrence des communautés bactériennes, fongiques et fusariennes sur les tiges de maïs (Cobo-Díaz et al., 2019a). Une approche de métabarcoding a été utilisée afin d'identifier la composition du pathobiome (en termes de bactéries et champignons) lié à la FHB sur le maïs en Bretagne. Ces auteurs ont établi des réseaux de co-occurrence, mettant par exemple en évidence des corrélations négatives entre certains genres bactérien et les espèces fusariennes. Cependant, ces derniers n'ont pas étudié l'effet du climat sur la composition des communautés microbiennes, ce qui s'avère indispensable pour appréhender les contaminations.

Enfin, une approche de prédiction de l'évolution du risque de contamination du maïs par les aflatoxines a été étudiée par Battilani et al. (2016).

Les travaux présentés dans cette thèse fournissent des informations clés qui pourront, à l'avenir, alimenter les modèles de prédiction de la FHB et le risque mycotoxine associé, comme cela a été fait par ces auteurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander, N. J., Proctor, R. H., & McCormick, S. P. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 198-215. <https://doi.org/10.1080/15569540903092142>
- Al-Hatmi, A. M. S., Van Den Ende, A. H. G. G., Stielow, J. B., Van Diepeningen, A. D., Seifert, K. A., McCormick, W., Assabgui, R., Gräfenhan, T., De Hoog, G. S., & Levesque, C. A. (2016). Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in *Fusarium*. *Fungal Biology*, 120(2), 231-245. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.006>
- Alshannaq, A., & Yu, J.-H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Angioni, A., Russo, M., La Rocca, C., Pinto, O., & Mantovani, A. (2022). Modified mycotoxins, a still unresolved issue. *Chemistry*, 4(4), 1498-1514. <https://doi.org/10.3390/chemistry4040099>
- Arseniuk, E., Foremska, E., G, T., Óral, ., & Chełkowski, J. (1999). *Fusarium* Head Blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (don) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*, 147(10), 577-590. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00433.x>
- Audenaert, K., Van Broeck, R., Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., Höfte, M., & Haesaert, G. (2009). *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: Population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology*, 125(3), 445-458. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9494-3>
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M., & Haesaert, G. (2013). Deoxynivalenol: A major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins*, 6(1), 1-19. <https://doi.org/10.3390/toxins6010001>
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., & Jacques, M.-A. (2015). Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1257-1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>
- Battilani, P., Toscano, P., Van Der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6(1), 24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Beccari, G., Colasante, V., Tini, F., Senatore, M. T., Prodi, A., Sulyok, M., & Covarelli, L. (2018). Causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in central Italy and their in vitro biosynthesis of secondary metabolites. *Food Microbiology*, 70, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.016>
- Beccari, G., Tini, F., Foroud, N. A., Ederli, L., Gardiner, D. M., Benfield, A. H., Harris, L. J., Sulyok, M., Romani, R., Bellezza, I., & Covarelli, L. (2024). A comparison between the role of enniatins and deoxynivalenol in *Fusarium* virulence on different tissues of common wheat. *BMC Plant Biology*, 24(1), 463. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04945-5>
- Bertani, I., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Subramoni, S., & Venturi, V. (2016). Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environmental Microbiology Reports*, 8(3), 388-398. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12403>

- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I. P., Seefelder, W., Speijers, G., & Stroka, J. (2013). Masked mycotoxins : A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, *57*(1), 165-186. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100764>
- Boenisch, M. J., & Schäfer, W. (2011). *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 110. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-110>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *108*, 611-624. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0001-7_2
- Boutigny, A.-L., Ward, T. J., Ballois, N., Iancu, G., & Iloos, R. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology*, *138*(1), 133-148. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0312-6>
- Boutigny, A.-L., Gautier, A., Basler, R., Dauthieux, F., Leite, S., Valade, R., Aguayo, J., Iloos, R., & Laval, V. (2019). Metabarcoding targeting the EF1 alpha region to assess *Fusarium* diversity on cereals. *PLOS ONE*, *14*(1), e0207988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207988>
- Brennan, J. M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B. M., & Doohan, F. M. (2003). Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 577-587. <https://doi.org/10.1023/A:1024712415326>
- Brown, N. A., Urban, M., Van De Meene, A. M. L., & Hammond-Kosack, K. E. (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum* : Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, *114*(7), 555-571. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.006>
- Burlakoti, R. R., Tamburic-Ilincic, L., Limay-Rios, V., & Burlakoti, P. (2017). Comparative population structure and trichothecene mycotoxin profiling of *Fusarium graminearum* from corn and wheat in Ontario, central Canada. *Plant Pathology*, *66*(1), 14-27. <https://doi.org/10.1111/ppa.12559>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2 : High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, *11*(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, *7*(5), 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

- Casu, A., Camardo Leggieri, M., Toscano, P., & Battilani, P. (2024). Changing climate, shifting mycotoxins : A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(2), e13323. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13323>
- Cendoya, E., Chiotta, M. L., Zachetti, V., Chulze, S. N., & Ramirez, M. L. (2018). Fumonisin and fumonisin-producing *Fusarium* occurrence in wheat and wheat by products : A review. *Journal of Cereal Science*, 80, 158-166. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521017309633>
- Chakraborty, S., & Newton, A. C. (2011). Climate change, plant diseases and food security : An overview. *Plant Pathology*, 60(1), 2-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x>
- Chrpová, J., Šíp, V., Sumíková, T., Salava, J., Palicová, J., Štočková, L., Džuman, Z., & Hajšlová, J. (2016). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Republic. *World Mycotoxin Journal*, 9(2), 317-328. <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1917>
- Cobo-Díaz, J. F., Baroncelli, R., Le Floch, G., & Picot, A. (2019a). Combined metabarcoding and co-occurrence network analysis to profile the bacterial, fungal and *Fusarium* communities and their interactions in maize stalks. *Frontiers in Microbiology*, 10, 261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00261>
- Cobo-Díaz, J. F., Baroncelli, R., Le Floch, G., & Picot, A. (2019b). A novel metabarcoding approach to investigate *Fusarium* species composition in soil and plant samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(7), fiz084. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz084>
- Cooney, J. M., Lauren, D. R., & Di Menna, M. E. (2001). Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 522-526. <https://doi.org/10.1021/jf0006372>
- Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., Ferrer, E., & Mañes, J. (2015). *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 540-551. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6772>
- Cundliffe, E., Cannon, M., & Davies, J. (1974). Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(1), 30-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.1.30>
- Cundliffe, E., & Davies, J. E. (1977). Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(3), 491-499. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.3.491>
- Del Ponte, E. M., Moreira, G. M., Ward, T. J., O'Donnell, K., Nicolli, C. P., Machado, F. J., Duffeck, M. R., Alves, K. S., Tessmann, D. J., Waalwijk, C., Van Der Lee, T., Zhang, H., Chulze, S. N., Stenglein, S. A., Pan, D., Vero, S., Vaillancourt, L. J., Schmale, D. G., Esker, P. D., ... Lee, T. (2022). *Fusarium graminearum* species complex : A bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. *The American Phytopathological Society*, 112(4), 741-751. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-06-21-0277-RVW>

- Delmas, C. E. L., Bancal, M., Leyronas, C., Robin, M., Vidal, T., & Launay, M. (2024). Monitoring the phenology of plant pathogenic fungi : Why and how? *Biological Reviews*, 99(3), 1075-1084. <https://doi.org/10.1111/brv.13058>
- Dill-Macky, R., & Jones, R. K. (2000). The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* Head Blight of wheat. *Plant Disease*, 84(1), 71-76. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.1.71>
- Edwards, S. G., & Jennings, P. (2018). Impact of agronomic factors on *Fusarium* mycotoxins in harvested wheat. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(12), 2443-2454. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1543954>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS : Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S., & Collin, J. (2000). Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(3), 286-292. <https://doi.org/10.1080/07060660009500477>
- Falentin, H., Auer, L., Mariadassou, M., Pascal, G., Rué, O., Dugat-Bony, E., Delbès, C., Nicolas, A., Rifa, E., Mondy, S., Boulch, M. L., Cauquil, L., Hernandez, G., Terrat, S., & Abraham, A.-L. (2019). Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 97, 46-69. (hal-02311421)23.
- Fink-Gremmels, J., & Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), 326-341. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.008>
- Focker, M., Van Der Fels-Klerx, H. J., Magan, N., Edwards, S. G., Grahovac, M., Bagi, F., Budakov, D., Suman, M., Schatzmayr, G., Krska, R., & De Nijs, M. (2021). The impact of management practices to prevent and control mycotoxins in the European food supply chain : MyToolBox project results. *World Mycotoxin Journal*, 14(2), 139-154. <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2588>
- Gaggiu, V. (2018). *Triticale* crop and contamination with mycotoxins under the influence of climate change - Global study [Review]. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 23, 30-45.
- Garcia-Cela, E., Verheecke-Vaessen, C., Magan, N., & Medina, A. (2018). The ``-omics'' contributions to the understanding of mycotoxin production under diverse environmental conditions. *Current Opinion in Food Science*, 23, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.005>
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., & Richard-Forget, F. (2020a). *Fusarium* Mycotoxins Enniatins : An updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(17), 4788-4798. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00411>
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.-N., Ducos, C., Tremblay, J., Chéreau, S., Atanasova, V., & Richard-Forget, F. (2020b). Investigating the efficiency of hydroxycinnamic acids to inhibit the production of enniatins by *Fusarium avenaceum* and modulate the expression of enniatins biosynthetic genes. *Toxins*, 12, 735. <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/12/735>

- Geiser, D. M., Del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., & O'donnell, K. (2004). *FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(5/6), 473-479. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>
- Geiser, D. M., Al-Hatmi, A. M. S., Aoki, T., Arie, T., Balmas, V., Barnes, I., Bergstrom, G. C., Bhattacharyya, M. K., Blomquist, C. L., Bowden, R. L., Brankovics, B., Brown, D. W., Burgess, L. W., Bushley, K., Busman, M., Cano-Lira, J. F., Carrillo, J. D., Chang, H.-X., Chen, C.-Y., ... Zhang, X. (2021). Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. *The American Phytopathological Society*, *111*(7), 1064-1079. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>
- Glinski, M., Urbanke, C., Hornbogen, T., & Zocher, R. (2002). Enniatin synthetase is a monomer with extended structure: Evidence for an intramolecular reaction mechanism. *Archives of Microbiology*, *178*(4), 267-273. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0451-1>
- Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, *5*(6), 515-525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>
- Hjelkrem, A.-G. R., Aamot, H. U., Brodal, G., Strand, E. C., Torp, T., Edwards, S. G., Dill-Macky, R., & Hofgaard, I. S. (2018). HT-2 and T-2 toxins in Norwegian oat grains related to weather conditions at different growth stages. *European Journal of Plant Pathology*, *151*(2), 501-514. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1394-3>
- Holland, J. M. (2004). The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe : Reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *103*(1), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.018>
- Hope, R., Aldred, D., & Magan, N. (2005). Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology*, *40*(4), 295-300. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01674.x>
- Hornbogen, T., Glinski, M., & Zocher, R. (2002). Biosynthesis of depsipeptide mycotoxins in *Fusarium*. In A. Logrieco, J. A. Bailey, L. Corazza, & B. M. Cooke (Éds.), *Mycotoxins in Plant Disease* (p. 713-718). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0001-7_15
- Imathiu, S. M., Hare, M. C., Ray, R. V., Back, M., & Edwards, S. G. (2010). Evaluation of pathogenicity and aggressiveness of *F. langsethiae* on oat and wheat seedlings relative to known seedling blight pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, *126*(2), 203-216. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9533-0>
- Inch, S. A., & Gilbert, J. (2003). Survival of *Gibberella zeae* in *Fusarium* -damaged wheat kernels. *Plant Disease*, *87*(3), 282-287. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.282>
- Infantino, A., Belocchi, A., Quaranta, F., Reverberi, M., Beccaccioli, M., Lombardi, D., & Vitale, M. (2023). Effects of climate change on the distribution of *Fusarium* spp. in Italy. *Science of The Total Environment*, *882*, 163640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163640>
- Ioos, R., Belhadj, A., & Menez, M. (2004). Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia*, *158*(3), 351-362. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-2228-3>

- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., Van Der Vossen, J., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Ching Chai, L., Chapman, J., & Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety : Translation into practice. *Food Microbiology*, *79*, 96-115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>
- Jestoi, M. (2008). Emerging *Fusarium* -Mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*(1), 21-49. <https://doi.org/10.1080/10408390601062021>
- Jiao, F., Kawakami, A., & Nakajima, T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and *Tri* gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiology Letters*, *285*(2), 212-219. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01235.x>
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A.-K., Steinberg, C., Persson, P., & Friberg, H. (2016). Genus-specific primers for study of *fusarium* communities in field samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(2), 491-501. <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-15>
- Karlsson, I., Persson, P., & Friberg, H. (2021). *Fusarium* Head Blight from a microbiome perspective. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 628373. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628373>
- Kazan, K., Gardiner, D. M., & Manners, J. M. (2012). On the trail of a cereal killer : Recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 399-413. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x>
- Keyser, Z., Vismer, H. F., & Klaasen, J. A. (1999). The antifungal effect of fumonisin B1 on *Fusarium* and other fungal species. *South African Journal of Science*, *95*, 455-458.
- Khanal, R., Hudson, K., Foster, A., Wang, X., Brauer, E. K., Witte, T. E., & Overy, D. P. (2024). Pathogenicity and metabolomic characterization of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* challenge in barley under controlled conditions. *Journal of Fungi*, *10*(10), 670. <https://doi.org/10.3390/jof10100670>
- Kim, H.-K., Lee, S., Jo, S.-M., McCormick, S. P., Butchko, R. A. E., Proctor, R. H., & Yun, S.-H. (2013). Functional roles of *FgLaeA* in controlling secondary metabolism, sexual development, and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, *8*(7), e68441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068441>
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(Pt_2), 346-351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>
- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., ... Edler, L. (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal*, *15*(9). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>

- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., & Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.015>
- Kokkonen, M., Medina, A., & Magan, N. (2012). Comparative study of water and temperature relations of growth and T-2/HT-2 toxin production by strains of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *World Mycotoxin Journal*, 5(4), 365-372. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1406>
- Kotsonis, F. N., & Ellison, R. A. (1975). Assay and relationship of HT-2 toxin and T-2 toxin formation in liquid culture. *Applied Microbiology*, 30(1), 33-37. <https://doi.org/10.1128/am.30.1.33-37.1975>
- Langseth, W., Bernhoft, A., Rundberget, T., & Kosiak, B. (1999). Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144, 103-113. <https://doi.org/10.1023/A:1007016820879>
- Leannec-Rialland, V., Cabezas-Cruz, A., Atanasova, V., Chereau, S., Ponts, N., Tonk, M., Vilcinskis, A., Ferrer, N., Valdés, J. J., & Richard-Forget, F. (2021). Tick defensin γ -core reduces *Fusarium graminearum* growth and abrogates mycotoxins production with high efficiency. *Scientific Reports*, 11(1), 7962. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86904-w>
- Lenc, L. (2015). *Fusarium* head blight (FHB) and *Fusarium* populations in grain of winter wheat grown in different cultivation systems. *Journal of Plant Protection Research*, 55(1), 94-109. <https://doi.org/10.1515/jppr-2015-0013>
- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2013). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), 97-111. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0098-5>
- Leslie, J. F., Moretti, A., Mesterházy, Á., Ameye, M., Audenaert, K., Singh, P. K., Richard-Forget, F., Chulze, S. N., Ponte, E. M. D., Chala, A., Battilani, P., & Logrieco, A. F. (2021). Key global actions for mycotoxin management in wheat and other small grains. *Toxins*, 13(10), 725. <https://doi.org/10.3390/toxins13100725>
- Leyva-Mir, S. G., García-León, E., Camacho-Tapia, M., Villaseñor-Mir, H. E., Leyva-Madriral, K. Y., Mora-Romero, G. A., & Tovar-Pedraza, J. M. (2022). Occurrence of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex causing *Fusarium* head blight of wheat in Mexico. *Plant Disease*, 106(10), 2755. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2467-PDN>
- Liang, J. M., Xayamongkhon, H., Broz, K., Dong, Y., McCormick, S. P., Abramova, S., Ward, T. J., Ma, Z. H., & Kistler, H. C. (2014). Temporal dynamics and population genetic structure of *Fusarium graminearum* in the upper Midwestern United States. *Fungal Genetics and Biology*, 73, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.002>
- Liang, J., Lofgren, L., Ma, Z., Ward, T. J., & Kistler, H. C. (2015). Population subdivision of *Fusarium graminearum* from barley and wheat in the upper midwestern United States at the turn of the century. *The American Phytopathological Society*, 105(11), 1466-1474. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0021-R>
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M. J., Logrieco, A., & Jimenez, M. (2004). Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(2), 253-260. <https://doi.org/10.1078/072320204322881871>

- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Makiola, A., Dickie, I. A., Holdaway, R. J., Wood, J. R., Orwin, K. H., Lee, C. K., & Glare, T. R. (2019). Biases in the metabarcoding of plant pathogens using rust fungi as a model system. *MicrobiologyOpen*, 8(7). <https://doi.org/10.1002/mbo3.780>
- Maldonado-Ramirez, S. L., Schmale, D. G., Shields, E. J., & Bergstrom, G. C. (2005). The relative abundance of viable spores of *Gibberella zeae* in the planetary boundary layer suggests the role of long-distance transport in regional epidemics of *Fusarium* head blight. *Agricultural and Forest Meteorology*, 132(1-2), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2005.06.007>
- Mallebrera, B., Prosperini, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2018). *In vitro* mechanisms of Beauvericin toxicity : A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 537-545. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.019>
- Marčiulynienė, D., Marčiulynas, A., Lynikienė, J., Vaičiukynė, M., Gedminas, A., & Menkis, A. (2021). DNA-Metabarcoding of belowground fungal communities in bare-root forest nurseries : focus on different tree species. *Microorganisms*, 9(1), 150. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010150>
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24(3), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., & Magan, N. (1998). Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102(7), 831-837. <https://doi.org/10.1017/S0953756297005777>
- McKnight, D. T., Huerlimann, R., Bower, D. S., Schwarzkopf, L., Alford, R. A., & Zenger, K. R. (2019). Methods for normalizing microbiome data : An ecological perspective. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(3), 389-400. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13115>
- Medina, A., & Magan, N. (2011). Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology*, 28(3), 392-398. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.012>
- Merhej, J., Boutigny, A. L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2010). Acidic pH as a determinant of *TRI* gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(5), 710-717. <https://doi.org/10.1080/19440040903514531>
- Merhej, J., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2011). Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium* : Recent advances and new insights. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 519-528. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3397-x>
- Meyneng, M., Lemonnier, H., Le Gendre, R., Plougoulen, G., Antypas, F., Ansquer, D., Serghine, J., Schmitt, S., & Siano, R. (2024). Subtropical coastal microbiome variations due to massive river runoff after a cyclonic event. *Environmental Microbiome*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00554-9>

- Mohammadi, T., Reesink, H. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Savelkoul, P. H. M. (2005). Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 285-288. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.018>
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C., & Karl, D. M. (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA Genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 60. <https://doi.org/10.1128/aem.60.3.871.879.1994>
- Mylona, K., Sulyok, M., & Magan, N. (2012). Relationship between environmental factors, dry matter loss and mycotoxin levels in stored wheat and maize infected with *Fusarium* species. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(7), 1118-1128. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.672340>
- Nahle, S., El Khoury, A., & Atoui, A. (2021). Current status on the molecular biology of zearalenone : Its biosynthesis and molecular detection of zearalenone producing *Fusarium* species. *European Journal of Plant Pathology*, 159(2), 247-258. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02173-9>
- Nazari, L., Patteri, E., Terzi, V., Morcia, C., & Rossi, V. (2014). Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology*, 39, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.009>
- Nazari, L., Patteri, E., Manstretta, V., Terzi, V., Morcia, C., Somma, S., Moretti, A., Ritieni, A., & Rossi, V. (2018). Effect of temperature on growth, wheat head infection, and nivalenol production by *Fusarium poae*. *Food Microbiology*, 76, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.015>
- Nelson, M. C., Morrison, H. G., Benjamino, J., Grim, S. L., & Graf, J. (2014). Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys. *PLoS ONE*, 9(4), e94249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094249>
- Nguyen, T. B. H., Henri-Sanvoisin, A., Coton, M., Le Floch, G., & Picot, A. (2024). Shifts in *Fusarium* communities and mycotoxins in maize residues, soils, and wheat grains throughout the wheat cycle : implications for *Fusarium* Head Blight epidemiology. *Microorganisms*, 12(9), 1783. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091783>
- Nogueira, M., Decundo, J., Martinez, M., Dieguez, S., Moreyra, F., Moreno, M., & Stenglein, S. (2018). Natural contamination with mycotoxins produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in malting barley in Argentina. *Toxins*, 10(2), 78. <https://doi.org/10.3390/toxins10020078>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K., & Casper, H. H. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum* , the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7905-7910. <https://doi.org/10.1073/pnas.130193297>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>

- Olomu, I. N., Pena-Cortes, L. C., Long, R. A., Vyas, A., Krichevskiy, O., Luellwitz, R., Singh, P., & Mulks, M. H. (2020). Elimination of “kitome” and “splashome” contamination results in lack of detection of a unique placental microbiome. *BMC Microbiology*, 20(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01839-y>
- Osborne, L. E., & Stein, J. M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032>
- Pál, N., Zsolt, V., & Géza, F. (2005). The effect of far UV radiation on the morphology and the ability of germination of conidia of *Fusarium culmorum*. *Cereal Research Communications*, 33(4), 763-768. <https://doi.org/10.1556/CRC.33.2005.2-3.146>
- Pancaldi, D., Tonti, S., Prodi, A., Salomoni, D., Prà, M. D., Nipoti, P., Alberti, I., & Pisi, A. (2010). Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(2), 258-266. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-3442
- Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., Boutigny, A.-L., Chrprová, J., Czembor, E., Gagkaeva, T., González-Jaén, M. T., Hofgaard, I. S., Köycü, N. D., Hoffmann, L., Lević, J., Marin, P., Miedaner, T., Migheli, Q., Moretti, A., ... Vogelgsang, S. (2016). A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00406>
- Pauvert, C., Buée, M., Laval, V., Edel-Hermann, V., Fauchery, L., Gautier, A., Lesur, I., Vallance, J., & Vacher, C. (2019). Bioinformatics matters : The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecology*, 41, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.03.005>
- Peter Mshelia, L., Selamat, J., Iskandar Putra Samsudin, N., Rafii, M. Y., Abdul Mutalib, N.-A., Nordin, N., & Berthiller, F. (2020). Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins*, 12(8), 478. <https://doi.org/10.3390/toxins12080478>
- Picot, A., Hourcade-Marcolla, D., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Richard-Forget, F., & Lannou, C. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology*, 61(1), 140-151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02503.x>
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, 581(3), 443-447. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.003>
- Prussin, A. J., Li, Q., Malla, R., Ross, S. D., & Schmale, D. G. (2014). Monitoring the long-distance transport of *Fusarium graminearum* from field-scale sources of Inoculum. *Plant Disease*, 98(4), 504-511. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0664-RE>
- Ramírez Albuquerque, D., Patriarca, A., & Fernández Pinto, V. (2021). Can discrepancies between *Fusarium graminearum* trichothecene genotype and chemotype be explained by the influence of temperature in the relative production of 3-ADON and 15-ADON? *Fungal Biology*, 125(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.004>

- Rineau, F., Groh, J., Claes, J., Grosjean, K., Mench, M., Moreno-Druet, M., Povilaitis, V., Pütz, T., Rutkowska, B., Schröder, P., Soudzilovskaia, N. A., Swinnen, X., Szulc, W., Thijs, S., Vandeborgh, J., Vangronsveld, J., Vereecken, H., Verhaege, K., Žydelis, R., & Loit, E. (2024). Limited effects of crop foliar Si fertilization on a marginal soil under a future climate scenario. *Heliyon*, *10*(1), e23882. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23882>
- Ryu, D., & Bullerman, L. B. (1999). Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883†. *Journal of Food Protection*, *62*(12), 1451-1455. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.12.1451>
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, *12*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmale Iii, D. G., Leslie, J. F., Zeller, K. A., Saleh, A. A., Shields, E. J., & Bergstrom, G. C. (2006). Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *The American Phytopathological Society*, *96*(9), 1021-1026. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1021>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Simpson, D. R., Thomsett, M. A., & Nicholson, P. (2004). Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environmental Microbiology*, *6*(1), 79-87. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00540.x>
- Siou, D., Gélisse, S., Laval, V., Elbelt, S., Repinçay, C., Bourdat-Deschamps, M., Suffert, F., & Lannou, C. (2015). Interactions between Head Blight Pathogens: Consequences for disease development and toxin production in wheat spikes. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(3), 957-965. <https://doi.org/10.1128/AEM.02879-14>
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., & Hymery, N. (2016). Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects. *Toxins*, *8*(4), 94. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- Steinmetz, W. E., Rodarte, C. B., & Lin, A. (2009). 3D QSAR study of the toxicity of trichothecene mycotoxins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(11), 4485-4489. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.06.012>

- Tan, J., Ameye, M., Landschoot, S., De Zutter, N., De Saeger, S., De Boevre, M., Abdallah, M. F., Van Der Lee, T., Waalwijk, C., & Audenaert, K. (2020). At the scene of the crime : New insights into the role of weakly pathogenic members of the *Fusarium* head blight disease complex. *Molecular Plant Pathology*, 21(12), 1559-1572. <https://doi.org/10.1111/mpp.12996>
- Tardif, C., Rouger, C., Miranda, J., Ahmed, O. S., Richard-Forget, F., Atanasova, V., & Waffo-Teguo, P. (2024). Targeting of antifungal metabolites from grapevine byproducts by UPLC–HRMS/MS approaches using bioactivity-based molecular networking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(17), 9621-9636. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c09531>
- Torp, M., & Nirenberg, H. I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 247-256. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503006172>
- Trail, F., & Common, R. (2000). Perithecial development by *Gibberella zeae* : A light microscopy study. *Mycologia*, 92(1), 130-138. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061137>
- Trail, F. (2009). For blighted waves of grain : *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*, 149(1), 103-110. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129684>
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes : Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 40-50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
- Tzec-Interián, J. A., Desgarenes, D., Carrión, G., Monribot-Villanueva, J. L., Guerrero-Analco, J. A., Ferrera-Rodríguez, O., Santos-Rodríguez, D. L., Liahut-Guin, N., Caballero-Reyes, G. E., & Ortiz-Castro, R. (2020). Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (*Persea americana* Miller) and their potential use in the biocontrol of *Scirtothrips perseae* (avocado thrips). *PLOS ONE*, 15(4), e0231215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231215>
- Ueno, Y., & Matsumoto, H. (1975). Inactivation of some thiol-enzymes by trichothecene mycotoxins from *Fusarium* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 23(10), 2439-2442. <https://doi.org/10.1248/cpb.23.2439>
- Valverde-Bogantes, E., Bianchini, A., Herr, J. R., Rose, D. J., Wegulo, S. N., & Hallen-Adams, H. E. (2020). Recent population changes of *Fusarium* head blight pathogens: Drivers and implications. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(3), 315-329. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1680442>
- Van Der Lee, T., Zhang, H., Van Diepeningen, A., & Waalwijk, C. (2015). Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes : A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 453-460. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.984244>
- Vaughan, M., Backhouse, D., & Ponte, E. M. D. (2016). Climate change impacts on the ecology of *Fusarium graminearum* species complex and susceptibility of wheat to *Fusarium* head blight : A review. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 685-700. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2053>

- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00289-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00289-0)
- Verheecke-Vaessen, C., Garcia-Cela, E., Lopez-Prieto, A., Osk Jonsdottir, I., Medina, A., & Magan, N. (2021). Water and temperature relations of *Fusarium langsethiae* strains and modelling of growth and T-2 and HT-2 mycotoxin production on oat-based matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 348, 109203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109203>
- Verheecke-Vaessen, C., Lopez-Pietro, A., Garcia-Cela, E., Medina, A., & Magan, N. (2022). Intra-species variability in *Fusarium langsethiae* strains in growth and T-2/HT-2 mycotoxin production in response to climate change abiotic factors. *World Mycotoxin Journal*, 15(1), 27-34. <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2584>
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Hecker, A., Jenny, E., Krska, R., Schuhmacher, R., & Forrer, H.-R. (2008). Toxicogenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 122(2), 265-276. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9279-0>
- Vogelgsang, S., Beyer, M., Pasquali, M., Jenny, E., Musa, T., Bucheli, T. D., Wettstein, F. E., & Forrer, H.-R. (2019). An eight-year survey of wheat shows distinctive effects of cropping factors on different *Fusarium* species and associated mycotoxins. *European Journal of Agronomy*, 105, 62-77. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.01.002>
- Waalwijk, C., Kastelein, P., De Vries, I., Kerényi, Z., Van Der Lee, T., Hesselink, T., Köhl, J., & Kema, G. (2003). Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 743-754. <https://doi.org/10.1023/A:1026086510156>
- Walder, F., Schlaeppli, K., Wittwer, R., Held, A. Y., Vogelgsang, S., & Van Der Heijden, M. G. A. (2017). Community profiling of *Fusarium* in combination with other plant-associated fungi in different crop species using SMRT sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02019>
- Walter, S., Nicholson, P., & Doohan, F. M. (2010). Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist*, 185(1), 54-66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x>
- Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W. W., & Hallen-Adams, H. (2015). Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection*, 73, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- Xu, X.-M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., Cooke, B. M., Doohan, F. M., Brennan, J. M., Moretti, A., Tocco, G., Mule, G., Hornok, L., Giczey, G., & Tatnell, J. (2005). Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology*, 112(2), 143-154. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2446-7>
- Xu, X., Nicholson, P., & Ritieni, A. (2007). Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.027>

Xu, X.-M., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Cooke, B. M., Doohan, F. M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mule, G., Hornok, L., Beki, E., Tatnell, J., Ritieni, A., & Edwards, S. G. (2008). Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *The American Phytopathological Society*, 98(1), 69-78. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-98-1-0069>

Yun, S.-H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (2000). Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 7-20. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1226>

Ouvrage, Rapport, Règlement, Bulletin.

Banik, M., Beyene, M., & Wang, X. (2018). *Fusarium* head blight of barley in Manitoba.

Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P. W., Trisos, C., Romero, J., Aldunce, P., Barrett, K., Blanco, G., Cheung, W. W. L., Connors, S., Denton, F., Diongue-Niang, A., Dodman, D., Garschagen, M., Geden, O., Hayward, B., Jones, C., ... Péan, C. (2023). IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. (First). Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). <https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647>

Charmet, G., Fardet, A., Abécassis, J., Lullien, V., & Forget, F. (2017). Agriculture et alimentation durables : Trois enjeux dans la filière céréales. Éditions Quae.

Des chiffres et des céréales—L'essentiel de la filière—Edition 2023. (2023). Intercéréales, 4-46.

Dubois, C., & Roucou, A. (2023). L'environnement agroclimatique agit sur l'équilibre de deux espèces. *Perspectives agricoles*, 515.

Gourdain, E., Batina, H., Du Cheyron, P., Fourrey, A., Gélisse, S., Grignon, G., Laval, V., Maumené, C., Méléard, B., & Valade, R. (2016). Lutte contre la fusariose des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthode de lutte. *Innovations Agronomiques*, 49, 133-145.

Roucou, A. (2023). Fusarioses sur blés : Le climat agit sur l'équilibre de deux espèces. *Perspectives agricoles*, 515.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2024). Règlement (UE) 2024/1038 de la Commission du 9 avril 2024 modifiant le règlement (UE) 2023/915 en ce qui concerne les teneurs maximales en toxines T-2 et HT-2 des denrées alimentaires. *EFSA Journal*.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2024). Règlement (UE) 2024/1022 de la Commission du 8 avril 2024 modifiant le règlement (UE) 2023/915 en ce qui concerne les teneurs maximales en déoxynivalénol des denrées alimentaires. *EFSA Journal*.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2022). The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0639en>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). FAO Strategy on Climate Change 2022–2031.

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau récapitulatif du nombre d'échantillons environnementaux étudiés dans le cadre de l'étude de métagénomique ciblée.

	Blé tendre	Blé dur	Total
2007	104	31	135
2008	76	38	114
2009	41	0	41
2014	22	22	44
2015	7	6	13
2016	36	27	63
2017	48	8	56
2018	96	48	144
2019	92	52	144
2020	96	58	154
2021	99	75	174
2022	98	93	191
TOTAL	815	458	1 273

Annexe 2 : Protocole d'extraction d'ADN au Sarkosyl. Protocole utilisé pour l'extraction d'ADN des Mock dans le chapitre 1 et des cocultures étudiées au Mexique dans la sous partie II de la partie 2 du chapitre 2.

- 1- Broyer le mycélium lyophilisé avec des billes en verre au Precellys Evolution (Bertin Technologies, Montigny le bretonneux, France).
- 2- Ajouter 1 mL de tampon de lyse au Sarkosyl (100 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 10 μ M d'EDTA et 2 % de sarkosyl) et homogénéiser au Precellys.
- 3- Reprendre 1 mL de solution de lyse et ajouter 1 mL de phénol saturé. Agiter par retournement, puis centrifuger 10 min à 4 °C, à 17 g.
- 4- Reprendre le surnageant et ajouter 1 volume de chloroforme isoamylique. Agiter par retournement puis centrifuger 10 min à 4 °C, à 17 g.
- 5- Récupérer le surnageant et ajouter 4 μ L de RNase A. Incuber 15 min à 37 °C. Répéter cette étape une deuxième fois.
- 6- Ajouter 7 μ L de protéinase K et incuber 15 min à 55 °C. Répéter cette étape une deuxième fois.
- 7- Ajouter 1 mL de phénol-chloroforme et agiter par inversion jusqu'à obtenir une émulsion. Centrifuger 10 min à 4 °C, à 17 g.
- 8- Reprendre le surnageant et ajouter 1mL de chloroforme isoamylique. Agiter par retournement et centrifuger 10 min à 4 °C, à 17 g.
- 9- Récupérer le surnageant et faire précipiter dans 1 mL d'éthanol absolu froid avec 20 μ L d'acétate de sodium (3 M). Incuber minimum 1h30 à -20 °C puis centrifuger 30 min à 4 °C, à 17 g.
- 10- Rincer le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol à 80 % puis centrifuger 10 min à 4 °C, à 17 g. Répéter cette étape deux autres fois avec de l'éthanol à 70 %.
- 11- Laisser sécher le culot puis suspendre dans 50 μ L d'eau DNase RNase free.
- 12- Conserver à 4 °C ou à -20 °C pour longue conservation

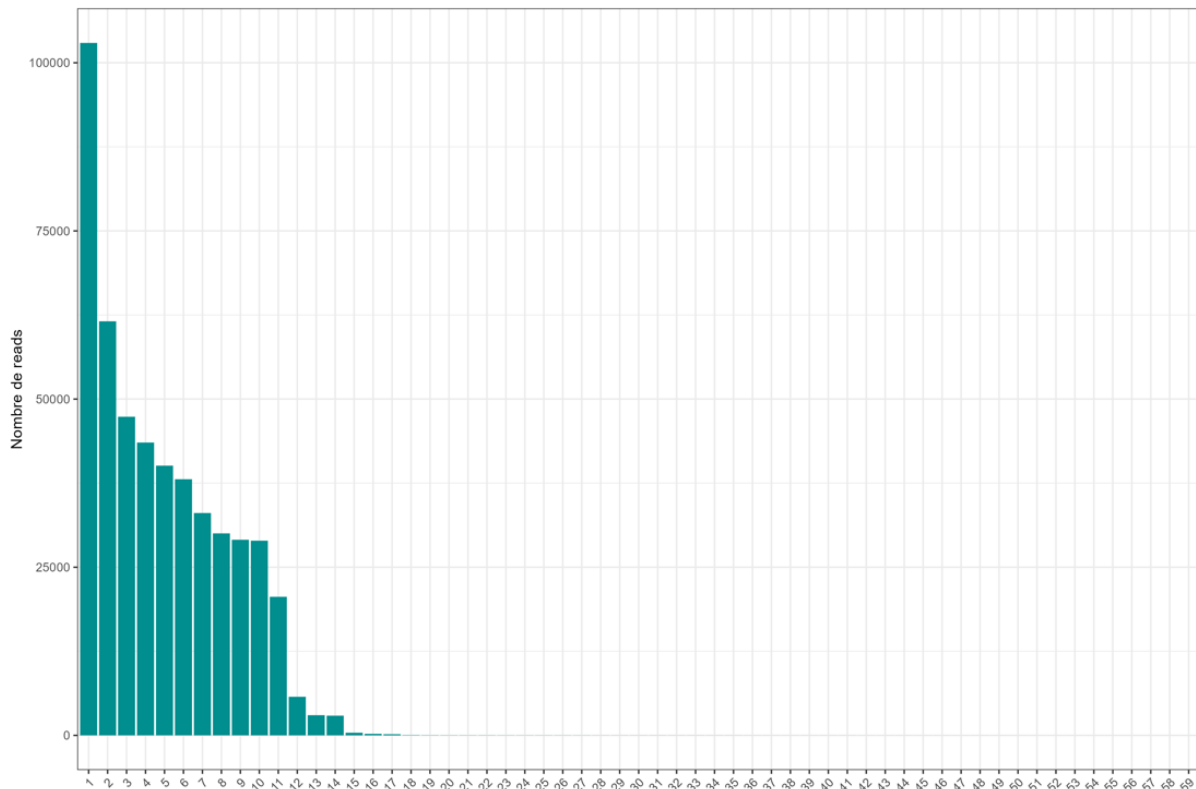
Annexe 3 : Etapes de filtration pour créer la base de données utilisée pour les analyses de métagénomique ciblée. Notre propre base de données a été créée à partir des bases de données décrites dans Boutigny et al. (2019) et Cobo-Díaz et al. (2019).

Afin d'obtenir notre base de données pour l'étude de métabarcoding, nous avons procédé comme suit :

- La base de données de Boutigny et al. (2019) a été filtrée de façon à ne conserver que les genres fongiques connus comme impliqués dans les maladies fréquentes sur blé (*Gaeumannomyces*, *Oculimacula*, *Ascochyta*, *Tilletia*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Drechslera*, *Rhizoctonia*, *Puccinia*, *Parastagonospora*, *Zymoseptoria* et *Typhula* ; <https://www.arvalis.fr/infos-techniques/connaitre-les-maladies-les-plus-frequentes-sur-ble>).
- Les séquences de moins de 200 pb ainsi que celles comportant des N ont été supprimées.
- La base de données filtrée ainsi que celle de Cobo-Díaz et al. (2019) ont ensuite été fusionnées et tous les duplicas de séquences ont été supprimés afin de ne conserver qu'un représentant de chaque espèce.
- Les 11 séquences d'ADN des Mock obtenues par séquençage Sanger ont été ajoutées.

Taille de la base de données finale : 2 017 séquences dont 270 références au genre *Fusarium* (13 % de la base de données).

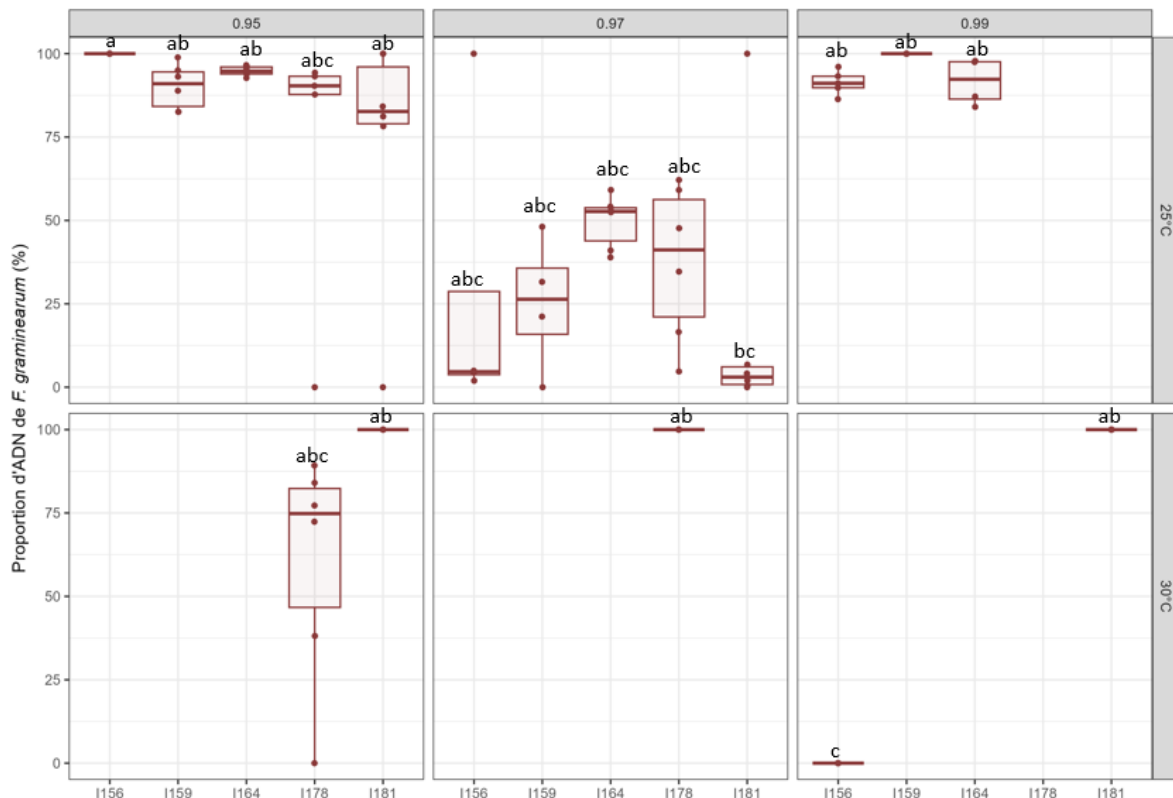
Annexe 4 : Nombre de séquences total identifiées pour les ASV assignés au rang de l'espèce de *Fusarium* dans les Mock. Le nombre de séquences (axe des ordonnées) a été calculé par la somme du nombre de séquences pour chaque ASV (axe des abscisses). Un décrochage est observé à partir du 12^{ème} ASV, les 11 premiers étant les plus représentatifs du jeu de données.



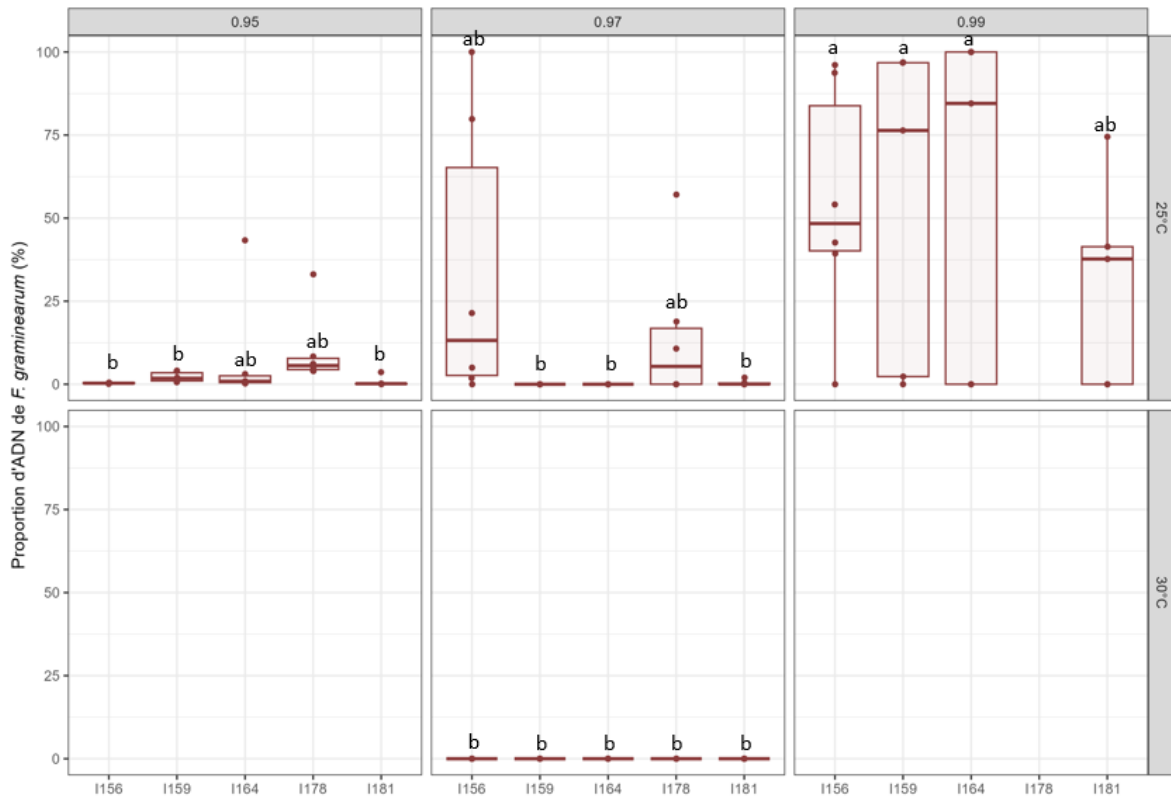
Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN en plaque 96 puits, au CTAB. Protocole utilisé pour l'extraction d'ADN fongique dans les cocultures.

- 1- Transférer le mycelium lyophilisé dans des tubes micronic (format plaque 96 puits).
- 2- Broyer le mycélium lyophilisé au Tissue Lyzer II (Qiagen, Hilden, Allemagne) avec une bille en acier : 2 fois 1 min 30 s à 25 cps.
- 3- Ajouter 400 µL de tampon de lyse au CTAB (100 mM de Tris, 1.4 mM de NaCl, 20 mM d'EDTA et 2 % de CTAB) et homogénéiser au Tissue Lyzer, 2 fois 30 s à 25 cps.
- 4- Incuber 20 min à 65 °C en agitant au bout de 10 min
- 5- Ajouter 400 µL de chloroforme isoamylique, agiter puis centrifuger 15 min à 17 g et à 4 °C.
- 6- Récupérer le surnageant et ajouter 300 µL de CTAB ainsi que 300 µL de chloroforme isoamylique. Agiter puis centrifuger 15 min à 17 g et à 4°C.
- 7- Récupérer le surnageant et ajouter ¾ de volume d'Isopropanol. Agiter puis laisser précipiter l'ADN pendant minimum 1h30 à -20 °C.
- 8- Centrifuger 15 min à 17 g et à 4 °C.
- 9- Eliminer le surnageant et rincer le culot d'ADN avec 500 µL d'éthanol à 70b%. Centrifuger 15 min à 17 g et à 4 °C.
- 10- Laisser sécher le culot puis le reprendre dans 30 µL d'eau DNase RNase free.
- 11- Conserver à 4 °C ou à -20 °C pour longue conservation

Annexe 6 : Proportion d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. avenaceum*, sous différentes conditions environnementales. Les proportions d'ADN (axe des ordonnées) ont été calculées pour chaque souche de *F. graminearum* (axe des abscisses) en fonction des quantités d'ADN de *F. poae*. Les différentes conditions d' a_w sont représentées en colonnes et les températures en lignes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les proportions (p -value < 0.05).



Annexe 7 : Proportion d'ADN de *F. graminearum* en coculture avec *F. poae*, sous différentes conditions environnementales. Les proportions d'ADN (axe des ordonnées) ont été calculées pour chaque souche de *F. graminearum* (axe des abscisses) en fonction des quantités d'ADN de *F. avenaceum*. Les différentes conditions d' a_w sont représentées en colonnes et les températures en lignes. Les lettres indiquent les différences significatives entre les proportions (p -value < 0.05).



Résumé

Potentiel adaptatif des espèces fusariennes toxigènes (*Fusarium spp.*) face aux changements climatiques : représentativité, écophysioles et interactions

La fusariose de l'épi de blé (FHB pour *Fusarium* Head Blight) est une des maladies fongiques les plus préoccupantes sur les céréales du monde entier. La FHB est due à une contamination par différentes espèces fongiques du genre *Fusarium*, capables d'infecter le même épi de blé simultanément. En plus des pertes de rendement induite par la contamination, les espèces de *Fusarium* produisent des mycotoxines qui représentent un réel risque pour les consommateurs et les animaux, ce qui induit également un enjeu sanitaire.

Le complexe *Fusarium* / blé est en constante interaction avec l'environnement, les facteurs climatiques et les pratiques culturales appliquées aux champs influençant la dynamique des populations fusariennes ainsi que le risque mycotoxines associé.

Ainsi, l'étude de l'évolution de la flore fongique toxigène au champ sous différentes contraintes climatiques est un point clef pour la prédiction et la maîtrise de la FHB.

Afin de mieux comprendre la dynamique des espèces fusariennes ainsi que leur potentiel adaptatif face aux changements climatiques, le sujet de thèse se construit autour de deux axes principaux.

Dans un premier temps, l'évolution de la prévalence des espèces de *Fusarium* a été étudiée en France, sur les 15 dernières années. Une approche de métabarcoding a été développée pour caractériser l'occurrence des espèces fusariennes dans les échantillons de blé. Les profils de production des mycotoxines associés ont également été traités. Les dynamiques spatio-temporelles des espèces fusariennes et des mycotoxines ont ainsi été mises en évidence. Une large base de données a été utilisée afin d'étudier différents facteurs agronomiques et climatiques.

Dans un second temps, les caractéristiques écophysioles des principales espèces fusariennes a été étudiée en réponse à des variations environnementales telles que la température et la disponibilité en eau. La croissance et la production de mycotoxines ont été étudiées in vitro, pour les espèces fusariennes seules mais également en interactions.

Mots clefs : champignon, phytopathogène, blé, distribution, caractéristiques, écophysiole, cocultures, environnement, variations

Abstract

Adaptive potential of toxigenic *Fusarium* species (*Fusarium spp.*) under climate change: representativeness, ecophysiology and interactions

Fusarium Head Blight (FHB) is one of the most devastating fungal diseases affecting cereals worldwide. This disease is caused by a complex of different fungal species, belonging to the *Fusarium* genus, that coexist within the same host plant. Beyond the yield losses due to infection, *Fusarium* species are able to produce mycotoxins that are harmful for humans and animals health. *Fusarium* / wheat complex is in constant interaction with the environment where climatic factors and agricultural practices drive the dynamics of *Fusarium* populations and the associated mycotoxin risk. Therefore, studying the evolution of *Fusarium* species under changing environment is required to allow predicting and controlling FHB.

To better understand species dynamics and their adaptive potential in the context of climate changes, this work focuses on two main areas.

On the one hand, changes in the occurrence of *Fusarium* species in France over the last 15 years were studied. A metabarcoding approach was used to characterize the distribution of *Fusarium* species in wheat samples, alongside the associated mycotoxin patterns. This study highlighted the spatio-temporal dynamics of *Fusarium* species and mycotoxins, using a large database that includes climatic data.

On the other hand, ecophysiological behaviours of *Fusarium* species were studied in response to combined temperature and water activity variations. Growth and mycotoxin production were measured in vitro, both in mono and co-cultures.

Keywords : fungus, plant pathogen, wheat, distribution, characteristics, ecophysiology, cocultures, environment, variations

Unité de recherche

Mycologie et Sécurité des aliments (MycSA), UR/1264, 71 avenue Edouard Bourlaux
33140 Villenave d'Ornon)