THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA
APAB : Agro-ressources, Procédés, Aliments et Bioproduits

Unité de recherche UMR Qualisud

Etude des mécanismes de biocontrôle d'agents microbiens vis-à-vis de *Fusarium graminearum* dans un objectif d'optimisation de leurs performances (spécificité, durabilité)

Présentée par Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE
Le 29 Septembre 2023

Sous la direction de Angélique FONTANA
et Caroline STRUB

Devant le jury composé de

Christian JAY-ALLEMAND, Professeur des Universités, Université de Montpellier	Président de jury
Monika COTON, Professeure des Universités, Université de Brest	Rapporteur
Florence FONTAINE, Professeure des Universités, Université de Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
Jean-Michel SAVOIE, Directeur de Recherches, INRAE de Bordeaux	Examinateur
Caroline STRUB, Professeure des Universités, Université de Montpellier	Co-Directrice de thèse
Angélique FONTANA, Maître de Conférences, Université de Montpellier	Co-Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

« Le rôle de l'infiniment petit dans la nature est infiniment grand. »

Louis Pasteur

RESUME

La nécessité de gérer les pathogènes des céréales augmentera à mesure que la production alimentaire continuera à s'intensifier pour nourrir une population humaine croissante. Le climat est un moteur important de la dynamique des populations microbiennes, de sorte que le changement climatique nécessitera des stratégies de gestion adaptatives pour faire face au changement de comportement des champignons phytopathogènes. Les fluctuations du climat se manifestent principalement par une augmentation des températures, des niveaux CO_2 et une modification de l'humidité relative. Il est donc important d'étudier l'impact des facteurs abiotiques liés aux variations climatiques sur les microorganismes pathogènes des céréales et leurs agents de biocontrôle (BCAs). Dans ce contexte, ce travail a consisté à étudier l'impact des perturbations du climat sur l'efficacité de trois BCAs commerciaux *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) et *Pythium oligandrum* (Polyversum®) contre l'agent causal de la fusariose de l'épi du blé, *Fusarium graminearum*, à l'aide de confrontations expérimentales *in vitro, in spicula* (épillets blé) et *in planta*. Il a été observé des effets contrastés des changements de température et d'humidité relative sur *F. graminearum*, les BCAs et leurs interactions à travers un plan expérimental de confrontations *in vitro* et sur épillets de blé. Les BCAs ont limité la croissance du pathogène quelles que soient les variations des facteurs abiotiques. Concernant la production de mycotoxines, un effet différentiel sur la production du déoxynivalénol (DON) et de la zéaralénone (ZEN) a été observé en fonction des conditions. L'efficacité des BCAs dans le contrôle de la contamination par les mycotoxines varie en fonction de la mycotoxine produite et des conditions de culture, indiquant une différence d'adaptation ou de mécanismes d'adaptation aux facteurs abiotiques entre les microorganismes. Les données expérimentales ont été utilisées pour concevoir des modèles mathématiques permettant de contribuer à la prédiction de la croissance des trois BCAs, la croissance et la production de DON de *F. graminearum* en fonction de la température, de l'humidité relative et de la présence ou absence de BCAs. L'impact de la température sur les mécanismes d'action des BCAs (antibiose, biotransformation des mycotoxines, synthèse d'enzymes lytiques…) ont été étudiés. L'augmentation de la température a affecté négativement la capacité des BCAs à inhiber la germination des spores du pathogène, leurs activités chitinolytiques, leur capacité de biotransformation du DON et d'inhibition de l'expression des gènes *tri5* et *tri8* du pathogène, impliqués dans la synthèse du DON. Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur l'effet des paramètres abiotiques sur l'interaction entre les BCAs et *F. graminearum*, en particulier sur la production de mycotoxines. Il ouvre la voie au développement de stratégies de biocontrôle des mycotoxines efficaces et résilientes contre *F. graminearum*, contribuant ainsi à la sécurité alimentaire mondiale.

Abstract

The need to manage cereal pathogens will increase as food production continues to intensify to feed a rapidly increasing human population. Climate is an important driver of microbial population dynamics, so climate change will require adaptive management strategies to cope with the changing behavior of plant pathogenic fungi. Fluctuations in climate are mainly manifested in increased temperatures, CO_2 levels and changes in relative humidity. It is therefore important to study the impact of abiotic factors linked to climatic variations on cereal pathogenic microorganisms and their biocontrol agents (BCAs). Against this background, this study investigated the impact of climate disturbances on the efficacy of three commercial BCAs *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) and *Pythium oligandrum* (Polyversum®) against the causal agent of Fusarium head blight in wheat, *Fusarium graminearum*, using experimental confrontations *in vitro*, *in spicula* (wheat spikelets) and *in planta*. Contrasting effects of temperature and relative humidity changes on *F. graminearum*, BCAs and their interactions were observed through an experimental design of *in vitro* and wheat spikelet confrontations. BCAs limited the pathogen's growth irrespective of variations in abiotic factors. Regarding mycotoxin production, a differential effect on the production of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) was observed depending on the growing conditions. The effectiveness of BCAs in controlling mycotoxinogenesis varied according to the mycotoxin produced and the growing conditions, indicating a difference in adaptation or coping mechanisms to abiotic factors between microorganisms. The experimental data were used to design mathematical models to help predict the growth of the three BCAs, the growth and DON production of *F. graminearum* as a function of temperature, relative humidity and the presence or absence of BCAs. The impact of temperature on the mechanisms of action of BCAs (antibiosis, mycotoxin biotransformation, lytic enzyme synthesis, etc.) was studied. Increased temperature adversely affected the ability of BCAs to inhibit pathogen spore germination, their chitinolytic activities, their DON biotransformation capacity and inhibition of expression of the pathogen's *tri5* and *tri8* genes, involved in DON synthesis. This work provides new insights into the effect of abiotic parameters on the interaction between BCAs and *F. graminearum*, especially on mycotoxin production. It paves the way for the development of effective and resilient mycotoxin biocontrol strategies using beneficial microorganisms against *F. graminearum*, thus contributing to global food security.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à rendre grâce à Dieu pour m'avoir donné la santé et la force qui m'ont permis d'arriver à cette étape. Il sera très difficile d'écrire cette partie car les mots pour magnifier ma reconnaissance envers ceux qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail m'échappent. Néanmoins je tiens à adresser ma gratitude et mes sincères remerciements à :

Mes deux directrices de thèse, Caroline STRUB et Angélique FONTANA, merci d'avoir encadré ce travail avec patience et bienveillance durant trois longues années pleines de rebondissements mais vous avez su me redonner courage à chaque instant difficile.

Merci également à l'ensemble des membres du comité de thèse : Stéphane COCIANCICH, Elsa BALLINI (un merci particulier pour m'avoir facilité l'acquisition du terreau pour mes cultures de blé), Alexandre COLAS DE LA NOUE, Selma P. SNINI, d'avoir suivi le projet chaque année, vous avez su apporter un regard extérieur et m'orienter dans la bonne direction.

Merci aussi à toute l'équipe Qualisud de l'Université de Montpellier pour votre soutien et accompagnement : Sabine SCHORR-GALINDO, Da LORN, Véronique MARTINEZ, Christophe JOURDAN, Catherine HOUEIX et Rémy MARCOUIRE.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du jury : Christian JAY-ALLEMAND, Jean-Michel SAVOIE, Monika COTON, Florence FONTAINE, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Un grand Merci également aux nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'intégration des différentes disciplines abordées dans cette étude :

- Francis COURTOIS, pour m'avoir accompagné dans la partie modélisation avec l'initiation sur PYTHON.
- Noël DURAND avec l'aide de Charlie POSS pour m'avoir accompagné dans l'analyse des mycotoxines.
- Julien FROUIN, pour m'avoir accompagné sur la plate-forme d'extraction d'acides nucléiques.
- Philipe CLAIR, qui m'a permis de mener à bien les expériences de RT-qPCR.
- Idrissa MBAYE, c'était un plaisir de collaborer avec toi sur les aspects de la modélisation.

Je souhaiterais adresser mes remerciements aussi à Lucile PELLAN, une personne exceptionnelle pour moi qui a contribué énormément dans mon cursus académique. Nous avons partagé des moments de

galères et de succès. Aujourd'hui nous sommes devenus une famille. Merci pour tous les conseils.

Merci à tous mes collègues doctorants du labo avec qui j'ai partagé des moments de réflexions, Reem AL RIACHY, Dorian AZNAR et Léna DOLE, je vous souhaite le meilleur pour la suite, finir vos thèses en beauté et voguer vers vos objectifs respectifs.

Je ne saurai finir sans remercier ma famille, particulièrement mes Mamans, mes Papas, mes frères et sœurs, mon cousin Mamoudou NIASS et sa famille, mon oncle Doudou BOYE ainsi que mes amis (Aicha GUEYE, Baboucar TAMBA et Abou BA, Mohamadou Lamine DIEDHIOU, Amadou DIALLO, Adama DIEDHIOU, Aida NGOM, Maty DIABATE, Mariama TALL, Malick BA) pour leur soutien et encouragements.

Un merci particulier à ma jumelle, ma femme Yaye Fatou KANDJI qui s'occupe de notre petite famille, pour son soutien, sa compréhension, ses encouragements…juste merci d'être toujours présente à mes côtés.

Je ne saurai citer tout le monde mais Merci à toute ma belle-famille et tous mes amis non cités, d'hier et d'aujourd'hui. A vous tous qui ont marqué ma vie, je dis merci et puisse ce modeste travail être à la hauteur de vos attentes.

Je dédie ce travail à ma grande sœur qui nous a quitté si tôt ''Feu Aissata DIEYE'' repose en paix sister.

Listes des figures

Synthèse bibliographique

Figure 1 : Les différents stade de développement du blé (du semis à la maturation), en cercle rouge, les stades propices à l'attaque par *F. graminearum* pour causer la fusariose de l'épi (son cycle de développement est dans la Figure 2).

Figure 2 : Le cycle de vie du champignon pathogène *Fusarium graminearum* en interaction avec le blé, *Triticum* spp (Http://campaigns.adama.com/france/fr/info-fusariose/).

Figure 3 : Carte de distribution et cooccurrence des mycotoxines à travers le monde (Mycotoxin Survey report 2021 by biomin.net).

Figure 4 : Structures chimiques du déoxynivalénol et de la zéaralénone.

Figure 5 : Récapitulatif des moyens de lutte contre les pathogènes de plante permettant d'agir sur la plante ou sur la pression parasitaire.

Chapitre 1/ Partie 1

Figure 1. Comparative effects of abiotic factors on the growth of BCA and *Fusarium graminearum*.

Figure 2. Comparative effects of BCA treatments (Mycostop®: *Streptomyces griseoviridis*, Xedavir®: *Trichoderma asperellum* and Polyversum®: *Pythium oligandrum*) and temperature (T°) variation on the growth of *F. graminearum*.

Figure 3. Comparative effects of abiotic conditions on mycotoxinogenesis of *F. graminearum.*

Figure 4. Comparative effects of BCAs treatments (Mycostop®: *Streptomyces griseoviridis*, Xedavir®: *Trichoderma asperellum* and Polyversum®: *Pythium oligandrum*), temperature (T°) variation (25°C and 30°C) and relative humidity (RH) variation (40%, 60% and 80%) on DON specific production of *F. graminearum*.

Figure 5. Comparative effects of BCAs treatments (Mycostop®: *Streptomyces griseoviridis*, Xedavir®: *Trichoderma asperellum* and Polyversum®: *Pythium oligandrum*), temperature (T°) variation (25°C and 30°C) and relative humidity (RH) variation (40%, 60% and 80%) on ZEN specific production of *F. graminearum*.

Chapitre 1/ Partie 2

Figure 1 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la colonisation externe des épillets par *F. graminearum.*

Figure 2 : Quantification comparative de biomarqueur de *F. graminearum* seul et confronté avec des BCAs (Mycostop®, Xedavir® et Polyversum®) sur des épillets détachés à 60% et 80% HR à 25°C.

Figure 3 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la production de Deoxynivalenol (DON) et de Zéaralénone (ZEN) par *F. graminearum* lors de confrontations sur des épillets détachés à deux humidités relatives différentes (60 : 60% HR et 80 : 80% HR).

Figure 4 : Symptômes de la fusariose à 7 et 14 jours après l'inoculation par pulvérisation d'épis de plantes entières de blé à 25°C et 80% d'humidité relative.

Figure 5 : Observation microscopique comparative (loupe binoculaire en haut, microscope optique en bas) d'épillets traité avec de l'eau ou de *F. graminearum* 14 jours après infection.

Figure 6 : Pourcentage d'épillets présentant des symptômes de fusariose sur l'ensemble des épis inoculés, 7 jours et 14 jours après l'inoculation par pulvérisation.

Figure 7 : Quantification comparative de biomarqueur de *F. graminearum* seul et confronté avec des BCAs (Mycostop®, Xedavir® et Polyversum®) sur différentes parties d'épillets.

Figure 8 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la production de Deoxynivalenol (DON) par *F. graminearum* lors de confrontations sur plantes de blé à 25°C et 80% HR, 7 et 14 jours après inoculation.

Figure 9 : Evaluation qualitative des grains de blé frais issus de confrontations sur des épis de plantes entières de blé à 25°C et 80% d'humidité relative.

Figure 10 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la teneur en mycotoxines par *F. graminearum* lors de confrontations sur plantes de blé à 25°C et 80% HR.

Chapitre 2

Figure 1. Comparative effects of abiotic factors on the growth of BCA and *Fusarium graminearum*.

Figure 2. *Fusarium graminearum*: Comparison of the kinetic growth radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

Figure 3. *Mycostop*: Comparison of the kinetic growth radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

Figure 4. *Xedavir*: Comparison of the kinetic growth radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

Figure 5. *Polyversum*: Comparison of the kinetic growth radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

Figure 6. Predicted growth values obtained with the final model versus observed growth values of all strains: *Fusarium graminearum* (red line), Mycostop (green line), Xedavir (sky blue line) and Polyversum (dark blue line).

Figure 7. Comparative effects of abiotic conditions on DON production by *F. graminearum* (alone or confronted): combine T° and RH (%) variation on predicted DON specific production.

Figure 8. Comparative effects of BCAs treatments and temperature (T°) variation regardless RH on DON specific production by *F. graminearum.*

Figure 9. Predicted DON specific production values obtained with the final mycotoxin model versus observed DON specific production values of *Fusarium graminearum*.

Chapitre 3

Figure 1: Effect of the increasing temperature (25°C and 30°C) on two BCAs efficacy in reducing *F. graminearum* germination spores.

Figure 2: Comparative effect of temperature (25°C and 30°) on BCA chitinase activities in presence or absence on *F. graminearum* powder.

Figure 3: Comparative effect of temperature (25°C and 30°C) on the biotransformation ability of DON by Xedavir and Polyversum.

Figure 4: Comparative temperature (25°C and 30°C) and BCAs treatment effects on *F. graminearum* trichothecene gene expression during confrontation assays.

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Principales mycotoxines produites par les espèces mycotoxinogènes.

Tableau 2 : Les toxines du genre *Fusarium*, leurs aliments cibles et leur répartition géographique.

Tableau 3 : Mécanismes d'action et effets identifiés des principales mycotoxines.

Tableau 4 : Concentrations maximales autorisées (CMA) des mycotoxines réglementées dans l'alimentation humaine (RÈGLEMENT (UE) 2023/915 DE LA COMMISSION du 25 avril 2023).

Tableau 5 : Liste de quelques microorganismes ayant une activité avérée ou possible contre les pathogènes du sol et de leur statut.

Chapitre 2

Table 1 A. Estimated growth parameters of the Gompertz modified equation (1), to estimate the effect of temperature and relative humidity on the growth rate of *F. graminearum* and Mycostop.

Table 1 B. Estimated growth parameters of the Gompertz modified equation (1), to estimate the effect of temperature and relative humidity on the growth rate of Xedavir and Polyversum.

Table 2. Coefficients of determination (R^2) and RMSEs for estimated growth parameters of the Gompertz modified equation (1) for the four species.

Table 3. Performance evaluation of the predictive models for the effects of temperature and relative humidity on the growth of the four species with Gompertz modified model and on the DON specific production of *F. graminearum* with polynomial model.

Chapitre 3

Table 1: Primer pair characteristics used for relative quantification by RT-qPCR.

Articles de recherches

1. **Impacts of abiotic factors on the growth of three commercial biological control agents, on the growth and mycotoxinogenesis of *Fusarium graminearum* and on their interaction**

Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Caroline STRUB [1], Angélique FONTANA [1]
[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France - Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France
Corresponding author: Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE (cheikhatdieye@gmail.com)

Published dans Journal of the Science of Food and Agriculture: DOI: https://doi.org/10.1002/jsfa.12991

2. **Modelling the effect of temperature and relative humidity on the growth rate of three commercial biological control agents, *Fusarium graminearum*, Deoxynivalenol production and BCAs-pathogen interaction**

Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE[1], Idrissa MBAYE[3], Francis COURTOIS[1], Noël DURAND[1,2], Sabine SCHORR-GALINDO[1], Angélique FONTANA[1], Caroline STRUB[1]
[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France - Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France
[3] Univ Alioune DIOP Bambey (UADB), Bambey, Sénégal
Corresponding author: Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE (cheikhatdieye@gmail.com)

In process to submission in: Food Microbiology

3. **Impact of temperature on biocontrol mechanisms of three commercial BCAs against *Fusarium graminearum***

Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Caroline STRUB [1], Angélique FONTANA [1]
[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France - Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France
Corresponding author: Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE (cheikhatdieye@gmail.com)

In process to submission

Participations à des congrès nationaux (CN)/internationaux (CI)

- 42nd Mycotoxin Workshop, Web conference, May 31 - June 02, 2021 (Poster-style presentations on fungal control and mycotoxin formation): presentation orale **(CI)**
  Study of biocontrol mechanisms of microbial agents against *Fusarium graminearum* to optimize their performance (specificity, durability).
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE[1], Sabine SCHORR-GALINDO[1], Noel DURAND[2], Caroline STRUB[1], Angélique FONTANA[1]
  [1]UMR Qualisud, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ d'Avignon, Univ de La Réunion, Montpellier, France.
  [2]CIRAD Montpellier, UMR Qualisud
  Lien: http://www.mycotoxin-workshop.de/ Email: mycotoxin2021@wwu.de

- Ecole d'été RIVE Santé Globale (KIM-RIVE Montpellier, 8 septembre 2021) Poster **(CN)**
  Maitrise du risque mycotoxique dans les aliments par le biocontrôle
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE[1], Sabine SCHORR-GALINDO[1], Noel DURAND[2], Caroline STRUB[1], Angélique FONTANA[1]
  [1]UMR Qualisud, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ d'Avignon, Univ de La Réunion, Montpellier, France.
  [2]CIRAD Montpellier, UMR Qualisud

- Journées du réseau FUSATOX : 14-15 octobre 2021 à INRAE Bordeaux Nouvelle Aquitaine (présentation orale) **(CN)**
  Impacts of abiotic conditions on the biocontrol of beneficial microorganisms against *Fusarium graminearum*
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE, Lucile PELLAN, Noël DURAND, Sabine Schorr-GALINDO, Caroline STRUB, Angélique FONTANA
  UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ d'Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion

- 43rd Mycotoxin Workshop 2022, Toulouse, May 30 – June 01, 2022 (Présentation orale) **(CI)**
  Impacts of abiotic conditions on the biocontrol of beneficial microorganisms against *Fusarium graminearum*
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Charlie POSS [1,2], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Angélique FONTANA [1], Caroline STRUB [1]
  [1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
  [2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France. Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France

- Third symposium on Plant BioProtection Sciences and Technologies Reims, June 28th – July 1st, 2022 (Présentation orale) **(CI)**
  Impacts of abiotic conditions on the biocontrol of beneficial microorganisms against *Fusarium graminearum*
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Charlie POSS [1,2], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Angélique FONTANA [1], Caroline STRUB [1]

[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France. Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France

- 5ème Congrès Natural Products and Biocontrol: 20-23 septembre 2022 à Perpignan, France (Poster) (**CI**)
  Impacts of abiotic conditions on the biocontrol of beneficial microorganisms against *Fusarium graminearum*
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Charlie POSS [1,2], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Angélique FONTANA [1], Caroline STRUB [1]
  [1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
  [2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France. Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France

- 9ème édition des Journées Mycotoxines à Marseille les 22 et 23 septembre 2022 (Poster) (**CN**)
  Impacts of abiotic conditions on the biocontrol of beneficial microorganisms against *Fusarium graminearum*
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [a], Charlie POSS [a, b], Noël DURAND [a, b], Sabine SCHORR-GALINDO [a], Angélique FONTANA [a], Caroline STRUB [a]
  [a]UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
  [b]CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France. Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France

- **17e congrès Microbes de la SFM, Montpellier - du 3 au 5 octobre 2022 (Poster) (CN)**
  Impacts of abiotic conditions on the biocontrol of beneficial microorganisms against *Fusarium graminearum*
  Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [a], Charlie POSS [a, b], Noël DURAND [a, b], Sabine SCHORR-GALINDO [a], Angélique FONTANA [a], Caroline STRUB [a]

  [a]UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
  [b]CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France. Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France

Table des matières

RESUME **5**
Abstract **6**
REMERCIEMENTS **7**
Listes des figures **9**
Liste des tableaux **13**
Articles de recherches **14**
Participations à des congrès nationaux (CN)/internationaux (CI) **15**
Table des matières **17**
Liste des abréviations **21**
INTRODUCTION GENERALE **1**
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **5**
I. Les phytopathogènes fongiques et leurs mycotoxines **7**
1. Les champignons phytopathogènes et / ou mycotoxinogènes 7
1.2. Le genre *Fusarium* 9
1.3. L'espèce *Fusarium graminearum,* agent causal de la fusariose de l'épi de blé (FHB) 11
1.3.1. Origine et caractéristiques générales 11
1.3.2. Le cycle d'infection de *F. graminearum* sur le blé 12
1.3.3. Les différentes étapes de colonisation du blé par *F. graminearum* 13
2. Les mycotoxines **14**
2.1. Historique 14
2.2. Les principales mycotoxines 15
2.2.1. Classification et toxicité 15
2.2.2. Occurrence et règlementation 17
2.3. Les conditions climatiques impactant le risque de présence de mycotoxines à travers le monde 21
2.4. Les mycotoxines produites par *F. graminearum* (Déoxynivalénol et Zéaralénone) 22
II. Les moyens de lutte contre les phytopathogènes fongiques et leurs mycotoxines **24**
1. La lutte intégrée dans le contrôle de *Fusarium graminearum* **25**
1.1. Les pratiques culturales adaptées 25
1.2. La surveillance sanitaire avec la modélisation comme moyen de prévention 26
1.2.1. Les modèles primaires de croissance applicables aux champignons 27
1.2.2. Les modèles secondaires de croissance applicables aux champignons 28
1.2.3. Les modèles applicables aux cinétiques de production des mycotoxines 28
2. Le contrôle biologique : une solution prometteuse **29**
2.1. L'utilisation d'agents de contrôle biologique 30
2.1.1. Les microorganismes de biocontrôle (BCA) 30
- *Streptomyces griseoviridis* (nom commercial : MYCOSTOP®) 32

- *Trichoderma asperellum* (nom commercial : XEDAVIR®) 32
- *Pythium oligandrum* (nom commercial : POLYVERSUM®) 34

2.1.2. Comment améliorer l'efficacité des agents microbiens de biocontrôle ? 35
2.1.3. Les mécanismes d'action des BCAs 36
2.1.3.1. Bio-compétition (spatiale ou nutritionnelle) 36
2.1.3.2. Mycoparasitisme/ Mycophagie/ Activité enzymatique 37
2.1.4.3. Antibiose (antibiotiques, composés volatils) 38
2.1.4.4. PGPR, PGPF (Plant Growth Promoting Rhizobacteria/Fungi) 38
2.1.4.5. Les mécanismes impactant la production de mycotoxines 38
2.1.5. Les enjeux des produits du contrôle biologique (avantages et limites) 39
2.2. Les différentes approches utilisées en recherche sur les mécanismes de biocontrôle 40
2.2.1. Les tests *in vitro* (confrontations directes sous différentes conditions abiotiques) 41
2.2.2. Les tests *in spicula* (confrontations sur épillets sous différentes conditions abiotiques) 41
2.2.3. Les tests *in planta* (confrontations directes sur plante) 42

OBJECTIFS DE LA THESE 61
RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION 63
Chapitre I 64
Partie 1 64
Impacts of abiotic factors on the growth of three commercial biological control agents, on the growth and mycotoxinogenesis of *Fusarium graminearum* and on their interaction 64
I. Introduction 68
II. Material and Methods 69
2.1. Micro-organisms and culture conditions 69
2.1.1. *Fusarium graminearum* 69
2.1.2. Commercial biological control agents (BCA) 70
2.2. *In vitro* confrontation 70
2.2.1. Experimental design 70
2.2.2. Culture media and growth evaluation 71
2.2.3. Mycotoxin extraction and analysis 71
2.3. Data expression and statistical analysis 72
III. Results 72
3.1. Impacts of abiotic factors on the growth of *F. graminearum* and BCAs 72
3.2. Impacts of temperature variation and BCAs on the growth of *F. graminearum* 74
3.3. Impacts of abiotic factors on mycotoxin (DON & ZEN) production of *F. graminearum* 75
3.4. Impact of abiotic and biotic (BCAs) factors on mycotoxin production of *F. graminearum* 77
IV. Discussion 79
Conclusion(s) 84
Partie 2 89
Evaluation *in spicula* et *in planta* des effets antifongiques d'agents de biocontrôle (BCAs) contre *Fusarium graminearum* sous différentes conditions d'humidité relative 89

1. Matériels et Méthodes 90
1.1. Confrontations *in spicula* entre BCAs et *F. graminearum* à 60 et 80% HR 90
1.2. Confrontations entre BCAs et *F. graminearum* sur la plante de blé 91
1.3. Extraction et quantification des mycotoxines 92
1.4. Quantification de *F. graminearum* par qPCR 92
2. Résultats et discussion 93
2.1. Impact des BCAs sur la colonisation externe des épillets par *F. graminearum* 93
2.2. Impact des BCAs sur la production de mycotoxines par *F. graminearum* sur épillets 95
2.3. Impact des BCAs sur le développement de *F. graminearum in planta* 98
2.4. Impact des BCAs sur la production de mycotoxines par *F. graminearum in planta* 101
2.5. Impact des BCAs sur la teneur en mycotoxines des grains de blé 102
Conclusion 104
Chapitre II 108
Modelling the effect of temperature and relative humidity on *Fusarium graminearum* and three commercial biological control agents (growth, Deoxynivalenol production and BCAs-pathogen interaction) 108
1. Introduction 111
2. Materials and Methods 112
2.1. Experimental design 112
2.2. Microorganisms and culture conditions 112
2.2.1. *Fusarium graminearum strain* 112
2.2.2. Commercial biological control agents (BCAs) 113
2.3. Culture media and growth evaluation 113
2.4. Deoxynivalenol extraction and analysis 113
2.5. Model development for *Fusarium graminearum* and BCAs growths 114
2.6. Modelling deoxynivalenol (DON) production 115
2.8. Statistical analysis 117
3. Results 117
3.1. Effect of temperature and relative humidity on the growth of *F. gaminearum* and BCAs 118
3.1.1. Primary modelling 119
3.1.2. Secondary modelling 120
3.1.3. Predicted versus observed growth values 123
3.2. Effect of temperature, relative humidity, and BCAs on the accumulation of mycotoxins 124
3.2.1. Modelling the DON production 124
3.3. Validation of growth and mycotoxin models 127
4. Discussion 128
Conclusion 133
Chapitre III 141
Impact of temperature variations on biocontrol mechanisms of three commercial BCAs against *Fusarium graminearum* 141

1. Introduction 144
2. Materiel and Methods 146
2.1. Micro-organisms and mycotoxin analysis 146
2.1.1. *Fusarium graminearum* 146
2.1.2. Commercial biological control agents (BCAs) 146
2.1.3. Mycotoxin extraction and analysis 146
2.2. Impact of temperature variation on BCA mechanisms 147
2.2.1. On the efficacy of BCAs in reducing *F. graminearum* spores' germination 147
2.2.2. On chitinase activities of BCAs 147
2.2.3. On BCA biotransformation of *F. graminearum* mycotoxin (DON) 148
2.2.4. On capacity of BCAs to impact the mycotoxin biosynthesis genes (*Tri5* and *Tri8*) 149
2.2.4.1. *In vitro* confrontation and sampling for RNA extraction 149
2.2.4.2. RNA extraction and RT-qPCR essay 149
2.3. Data expression and statistical analysis 150
3. Results 150
3.1. Impact of temperature on BCAs efficacy in reducing *F. graminearum* germination 150
3.2. Effect of increase in temperature on BCAs chitinases activities 151
3.3. Temperature effect on biotransformation ability of DON by BCAs 153
3.4. Impact of temperature on BCAs ability to impact the mycotoxins biosynthesis pathways genes (*Tri5* and *Tri8*) of *F. graminearum.* 155
4. Discussion 156
Conclusion 161
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 171

Liste des abréviations

15-ADON : 15-acétyldéoxynivalénol

3-ADON : 3- acétyldéoxynivalénol

DON : Déoxynivalénol

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AUGC: Area Under Growth Curve

AUDSPC: Area Under DON Specific Production Curve

AUZSPC: Area Under ZEN Specific Production Curve

CYA, CYB: Czapeck Yeast Agar, Czapeck Yeast Broth

CWDE: Cells Wall Degrade Enzymes

D3G: DON-3-O-glucoside

ddPCR : Digital Droplet Polymerase Chain Reaction

DPI : Jours Post-Inoculation

DOM1 : De-Epoxy-Déoxynivalénol

DON : Déoxynivalénol

FB1, FB2, FB3: Fumonisine B1, Fumonisine B2, Fumonisine B3

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse

HPI : Heures Post-Inoculation

HPLC-MS-MS : Chromatographie en phase liquide haute performance-spectrométrie de masse en tandem

ISP-2: International Streptomyces Project 2

NIV: Nivalénol

PGPR, PGPF: Plant Growth Promoting Rhizobacteria / Fungi

PDA: Potatoes Dextrose Agar

PDB: Potatoes Dextrose Broth

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RPM: Rotation par minute

RT: Reverse Transcription

ZEN: zéaralénone

INTRODUCTION GENERALE

La sécurité alimentaire est devenue une préoccupation majeure dans le monde entier. La nécessité de gérer les agents pathogènes des céréales augmentera à mesure que la production alimentaire continuera à s'intensifier pour nourrir une population humaine en pleine croissance. Le climat est un moteur important de la dynamique des populations microbiennes, de sorte que ses variations nécessiteront des stratégies de gestion adaptatives pour faire face à la modification du comportement des phytopathogènes.

De nos jours, les productions agricoles sont soumises à un double enjeu avec, d'une part, des conditions climatiques très évolutives favorables au développement microbien et, d'autre part, une volonté sociétale et politique de réduire l'utilisation des produits phytosanitaires (Pellan *et al.*, 2020). Les cultures céréalières ne sont pas à l'abri de ces changements globaux. Elles constituent l'une des familles de plantes les plus cultivées au monde et elles sont souvent attaquées par des agents pathogènes qui compromettent la production avant et après la récolte. Les effets potentiels des variations du climat sur les rendements et la qualité de ces cultures font désormais l'objet d'une attention scientifique, en particulier du point de vue de l'analyse des risques (Jank *et al.*, 2020; Kpan Kpan *et al.*, 2022; Ng'ang'a *et al.*, 2022). C'est particulièrement le cas de la culture de blé qui doit faire face à des maladies fongiques qui impactent les rendements et contaminent les grains et les produits et contre lesquelles les pesticides chimiques sont encore systématiquement utilisés.

Certains de ces phytopathogènes peuvent également produire des mycotoxines, ce qui implique des risques pour les santés humaine et animale. Les mycotoxines sont de petites molécules toxiques issues du métabolisme secondaire de certaines moisissures. Parmi les champignons producteurs de mycotoxines, le genre *Fusarium* fait partie des plus répandus et représente un risque important (Drakopoulos *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2022). L'espèce *F. graminearum*, phytopathogène du blé, peut produire des trichothécènes : nivalénol (NIV), déoxynivalénol (DON), 3-acétyl-désoxynivalénol (3-ADON) et 15-acétyl-désoxynivalénol (15-ADON) mais aussi de la zéaralénone (ZEN) (Chen *et al.*, 2019; Palacios *et al.*, 2021). Il est donc urgent de proposer des alternatives naturelles aux pesticides conventionnels pour les grandes cultures.

Parmi ces alternatives, le biocontrôle est une solution intéressante. Les stratégies de biocontrôle basées sur l'utilisation de microorganismes bénéfiques participent à la transition agroécologique (Rodríguez *et al.*, 2022). Ces microorganismes sont proposés comme une solution environnementale prometteuse et une option pratique contre les pathogènes du genre *Fusarium* (Abbas and Yli-Mattila, 2022; Haddoudi *et al.*, 2021; Madriz-Ordeñana *et al.*, 2022). Cependant, leur efficacité dépend des conditions environnementales et également de la capacité des taxons de *Fusarium* à s'adapter à des conditions qui leur sont défavorables (Altieri *et al.*, 2023; Fedele *et al.*, 2020; Magan, 2020; Moosavi, 2020). Les agents de biocontrôle (BCAs) peuvent inhiber ou réduire la progression des pathogènes et la

contamination par leurs toxines par plusieurs mécanismes (Pellan *et al.*, 2021). Ces derniers peuvent être directs, comme la compétition pour l'espace ou les nutriments, la production de composés antimicrobiens, le parasitisme ou la biotransformation des toxines. Ils peuvent également être indirects, liés à l'amélioration de la santé de la plante et de sa capacité à lutter contre ces agresseurs, en tant que mécanismes de stimulation de la croissance, de la défense ou d'acquisition aisée de nutriments (Adeleke *et al.*, 2022; Asad, 2022; Palmieri *et al.*, 2022). Il convient toutefois de noter que les produits de biocontrôle, et plus précisément les microorganismes bénéfiques, sont souvent jugés inefficaces dans certaines conditions environnementales (Magan, 2020). Ce manque d'efficacité peut être dû à des conditions climatiques très évolutives, plus favorables au développement et à l'adaptation des pathogènes. Malgré les nombreuses recherches dans ce domaine, des interrogations persistent toujours sur les verrous qui empêchent un biocontrôle efficace et durable de *F. graminearum* par les BCAs (Desai *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2023; Timmusk *et al.*, 2020). Parmi les principaux verrous à l'utilisation des microorganismes en biocontrôle figurent leur capacité à être utilisés, développés ou se maintenir dans différents agroécosystèmes, la méconnaissance de leur spécificité, la durabilité de leur efficacité avec les conditions environnementales évolutives, mais aussi la faible connaissance des effets non intentionnels sur les organismes non-cibles (Calvo *et al.*, 2021; Daryaei *et al.*, 2016a, 2016b; Porras *et al.*, 2002).

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse mené durant ces trois dernières années dans l'UMR Qualisud à l'Université de Montpellier. L'objectif de ce travail a été d'identifier l'impact de perturbations du climat sur l'efficacité de trois BCAs commerciaux *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) et *Pythium oligandrum* (Polyversum®) contre l'agent causal de la fusariose de l'épi du blé, *Fusarium graminearum,* afin de proposer une utilisation plus efficace et durable du biocontrôle, à l'aide de confrontations expérimentales *in vitro*, *in spicula* (épillets de blé) et *in planta*.

- La première étude du projet s'est focalisée sur l'identification des conditions de température et d'humidité relative favorables à l'efficacité des trois BCAs contre *F. graminearum*. Ces éléments pourraient constituer un outil d'aide à la décision à destination des producteurs, en les aidant à choisir et utiliser l'un d'entre eux en fonction des conditions météorologiques observées dans leurs champs à des stades du cycle de vie de la plante et du champignon qui sont critiques pour l'infection et la production de mycotoxines. Un plan expérimental a été mis en place dans différentes conditions abiotiques pour déterminer l'impact de différentes valeurs de températures et d'humidités relatives sur la croissance des trois BCAs, du pathogène, sur la mycotoxinogenèse de *F. graminearum* et sur leur interaction.

- La deuxième étude s'est centrée sur la conception de modèles, à partir des données expérimentales de la première étude, capables de prédire la croissance des trois BCAs ainsi que la croissance et la production de DON de *F. graminearum* en fonction de la température (T), de l'humidité relative (HR) et de la présence ou absence de BCA en utilisant une approche de modélisation en deux étapes, comprenant une modélisation primaire et une modélisation secondaire.
- Une troisième étude a été consacrée à l'impact de la température sur les mécanismes d'action des BCAs (antibiose, biotransformation des mycotoxines, synthèse d'enzymes lytiques, inhibition des gènes de synthèse des mycotoxines) afin de contribuer à une meilleure compréhension de la régulation de l'action des BCAs par la température.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette partie présente l'état de l'art sur les phytopathogènes fongiques, les mycotoxines et les pathologies associées, en particulier celles provoquées par *F. graminearum* et ses mycotoxines, ainsi que les solutions existantes pour lutter contre ces dernières allant de l'utilisation des produits chimiques jusqu'au biocontrôle. La partie consacrée au biocontrôle va s'intéresser en particulier à l'utilisation de microorganismes antagonistes et aux facteurs pouvant entraver leur efficacité. Enfin, les BCAs commerciaux étudiés dans cette thèse seront présentés.

I. Les phytopathogènes fongiques et leurs mycotoxines

1. Les champignons phytopathogènes et / ou mycotoxinogènes

Les champignons phytopathogènes sont des organismes pluricellulaires appartenant au règne des Fungi qui comprend un large éventail de champignons macroscopiques et microscopiques (Grigoriev *et al.*, 2014). Les champignons microscopiques filamenteux également appelés moisissures font l'objet de cette étude en parie. Les moisissures font partie des principales causes de maladies chez les plantes et sont responsables d'environ 70 % des maladies des plantes cultivées (Deacon, 2005). Il est estimé qu'il existe entre dix mille et quinze mille espèces de champignons ou pseudo-champignons susceptibles d'infecter les plantes (Fernandez-Acero *et al.*, 2007) et parmi eux, existent des mycotoxinogènes c'est-à-dire qu'ils sont capables de synthétiser des mycotoxines. Les moisissures mycotoxinogènes peuvent affecter plusieurs espèces de plantes et causent de nombreuses pertes en termes de rendement mais aussi en termes de qualité des récoltes et peuvent éventuellement avoir un effet néfaste sur la santé des consommateurs et des animaux à cause de la production de mycotoxines (Dey *et al.*, 2022; El-Sayed *et al.*, 2022).

1.1. Les champignons producteurs de mycotoxines

Les moisissures mycotoxinogènes sont capables de proliférer sur presque tous les substrats organiques et synthétiser diverses mycotoxines tout au long de la chaîne alimentaire, du champ à la table, lorsque les conditions environnementales sont favorables. Leurs mycotoxines peuvent contaminer une large gamme de cultures et de denrées alimentaires (céréales, oléagineux, épices, fruits, fruits séchés, noix, pommes, grains de café) et sont principalement produites par cinq genres : *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium, Alternaria* et *Claviceps* (Laut *et al.*, 2023; Nganou Donkeng *et al.*, 2022; Pitt, 2000; Sara and Ahmed, 2023). Cette contamination peut se produire avant ou après récolte, pendant la conservation, et sur, ou, dans les aliments. Le tableau 1 résume les différentes espèces mycotoxinogènes et leurs mycotoxines produites.

Tableau 1 : Principales mycotoxines produites par les espèces mycotoxinogènes (Dey *et al.*, 2022; Latham *et al.*, 2023; Nikitin *et al.*, 2023; Pitt, 2000; Rashad *et al.*, 2023; Bennett and Klich, 2003; Ismail, 2023)

Genres	**Espèces**	**Toxines produites**
Fusarium	*Fusarium culmorum*	Trichothécènes B, Zéaralénone, Culmorine, Fusarine C
	Fusarium avenaceum	Moniliformine, Fusarine C
	Fusarium graminearum	Trichothécènes B, Zéaralénone

	Fusarium oxysporum	Acide fusarique, Moniliformine, Oxysporine
	Fusarium poae	Trichothécènes A, Fusarine C
	Fusarium proliferatum	Moniliformine
	Fusarium sporotrichioides	Trichothécènes A, Zéaralénone, Fusarine C
	Fusarium verticillioides	Fumonisines, Fusarine C, Moniliformine, Naphtoquinone, Gibberelines
Aspergillus	*Aspergillus carneus*	Citrinine
	Aspergillus clavatus	Acide kojique, Patuline, Xanthocilline
	Aspergillus flavus	Aflatoxines B1 et B2, Acide aspergillique, Acide cyclopiazonique, Acide kojique
	Aspergillus fumigatus	Fumigaclavine, Fumagiline, Fumitoxine, Fumitremorgine A et C, Gliotoxine
	Aspergillus niger	Malformine, Naftoquinone
	Aspergillus ochraceus	Acide kojique, Ochratoxines, Acide pénicillique, Acide sécalonique A
	Aspergillus oryzae	Acide cyclopiazonique, Acide kojique
	Aspergillus parasiticus	Aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, Acide aspergillique, Acide kojique
	Aspergillus terreus	Citrinine, Patuline, Territrem, Terréine, Terrétonine
	Aspergillus versicolor	Stérigmatocystine
	Aspergillus sydowii	Stérigmatocystine, Griséofulvine
	Aspergillus candidus	Candiduline
Penicillium	*Penicillium chrysogenum*	Acide cyclopiazonique, Roquefortine C
	Penicillium verrucosum	Ochratoxine A, Citrinine
	Penicillium nordicum	Ochratoxine A
	Penicillium roqueforti	Acide pénicillique, Roquefortine C
	Penicillium expansum	Citrinine, Patuline, Roquefortine C
	Penicillium viridicatum	Ochratoxine A, Citrinine
	Penicillium cyclopium	Ochratoxine A, Citrinine
	Penicillium citrinum	Citrinine
	Penicillium oxalicum	Roquefortine C, Acide sécalonique D
	Penicillium crustosum	Pénitrem A, Roquefortine C

	Penicillium griseofulvum	Acide cyclopiazonique, Patuline, Roquefortine C, Griséofulvine
Alternaria	*Alternaria brassicicola*	Alternariol, Alternariol monométhylether
	Alternaria oryzae	Acide ténuazonique
	Alternaria solani	Alternariol, Alternariol monométhylether, Acide ténuazonique
	Alternaria radicina	Acide ténuazonique, Altertoxines I, II, III
	Alternaria cassiae	Altertoxines I, II, III
	Alternaria tenuissima	Tentoxine
	Alternaria alternata	Alternariol, Altuène, Acide L-ténuazonique
Claviceps	*Claviceps fusiformis*	Clavine, Elymoclavine
	Claviceps paspali	Acide lysergique, Chanoclavine
	Claviceps purpurea	Acide lysergique, Chanoclavine, Ergotamine, Agroclavine Ergocriptine, Ergosine, Chanoclavine
	Claviceps africana	Clavine, Dihydroergosine

1.2. Le genre *Fusarium*

Parmi les phytopathogènes mycotoxinogènes, le genre *Fusarium* représente un risque majeur (Arrúa *et al*., 2019; Tarazona *et al*., 2021). Les *Fusaria* sont des champignons filamenteux appartenant aux Deutéromycètes (Ait Kettout and Rahmania, 2010). Certaines formes sexuées (*Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*) sont connues et rattachées à l'embranchement des Ascomycètes. Ce genre comprend entre 50 et 100 espèces anamorphes (Nelson *et al*., 1983; Leslie and Summerell, 2008). Le genre *Fusarium* tire son nom du latin « *fusus* » qui signifie fuseau, en référence à la forme des conidies. Il renferme des espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des fusarioses chez de nombreuses plantes. Il regroupe aussi des espèces saprophytes capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents (Urban *et al*., 2002). La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont responsables d'intoxication chez les hommes et les animaux d'élevage (Latham *et al*., 2023). Les *Fusaria* sont cosmopolites, ils sont présents dans toutes les régions du monde, des régions tropicales et désertiques aux régions tempérées, leur température idéale de croissance étant située entre 22 et 35°C (Backhouse, 2014; Nazari *et al*., 2014; Ramirez *et al*., 2006). Du fait de l'existence de chlamydospores chez certaines espèces, la conservation du mycélium dans le sol et sa dissémination sont facilitées (Kotowicz *et al*., 2014; Pfohl-Leszkowicz, 1999). Ils forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable selon les espèces et le milieu de culture. La classification taxonomique des espèces de *Fusarium* est complexe

et s'est historiquement effectuée sur la base d'observations visuelles (comme l'aspect des conidiospores : macroconidies en forme de faucille). Le genre *Fusarium* a d'abord été classé principalement sur des critères de morphologie ; cependant, à partir des années 1990, cette classification a inclus d'avantage des concepts de biologie (impliquant une reproduction sexuée) et phylogénétique (particulièrement pour des espèces ne produisant pas systématiquement un stade sexuel) (Summerell *et al*., 2010). Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence des macroconidies fusiformes et cloisonnées. Les phialides présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides) (Chabasse *et al.*, 2002). Les spores de ce genre se présentent sous deux formes : les microconidies (unicellulaire ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolés, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticillioides*)) et les macroconidies (conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales). Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant une sorte de talon plus ou moins visible.

Beaucoup d'espèces de *Fusarium* suivent un mode de vie hémibiotrophe, c'est-à-dire qu'elles se développent au sein d'un organisme vivant, et, en causant sa mort, se nourrissent des tissus morts. Cela se traduit par l'apparition de pourriture, flétrissement, chancre ou de rouille (Pradhan *et al.*, 2020). Par conséquent, les maladies causées par ce genre de champignon ont un impact conséquent sur les végétaux cibles et leurs consommateurs. Les espèces de *Fusarium* sont regroupées au sein de complexes d'espèces. Un complexe d'espèces regroupe des espèces phylogénétiquement distinctes mais qui ne peuvent être discriminées par des caractères morphologiques. Parmi ces complexes, quatre sont phytopathogènes : *Fusarium fujikuroi, F. graminearum, F. solani* et *F. oxysporum* (Aoki, 2022; Aoki *et al.*, 2014). *Fusarium graminearum* et *F. oxysporum* sont respectivement classés 4ème et 5ème du point de vue des champignons pathogènes pour les plantes en raison de leur prédominance , leur gravité, leur niveau de surveillance et de leur potentiel mycotoxinogène (Dean *et al.*, 2012). En 2019, une étude réalisée sur 22318 échantillons provenant de cultures de maïs, de blé, de soja, de leurs produits dérivés et de la nourriture pour bétail a montré que la majorité des échantillons testés étaient contaminés par des mycotoxines (DON, fumonisines, et zéaralénone) à des valeurs supérieures au seuil autorisé. Ces principales mycotoxines sont synthétisées par *F. graminearum* et *F. verticillioides* (Gruber-Dorninger *et al.*, 2019). Les complexes *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum,* classés parmi les phytopathogènes fongiques les plus importants, provoquent respectivement la fusariose du blé et de l'orge, et la fusariose vasculaire sur un grand nombre de plantes. *Fusarium graminearum* produit des mycotoxines appartenant au groupe des trichothécènes et de la Zéaralénone.

Le tableau 2 présente quelques espèces du genre *Fusarium*, leurs toxines règlementées, les aliments concernés et leur répartition géographique.

Tableau 2 : Les toxines du genre *Fusarium*, leurs aliments cibles et leur répartition géographique (Bennett and Klich, 2003; Chen *et al*., 2019; Leslie and Summerell, 2008; Palacios *et al*., 2021)

Toxines	Espèces de *Fusarium*	Aliments concernés	Répartition Géographique
Fumonisines	*F. verticillioides* *F. proliferatum*	Céréales (maïs, sorgho, blé), chips	Répartition mondiale. Moins présentes en Europe et Canada
Zéaralénone	*F. graminearum* *F. culmorum* *F. crookwellense*	Céréales, semoules, farines	Canada, Russie Asie du Sud-est
Trichothécènes	*F. graminearum* *F. culmorum,* *F. tricinctum* *F. crookwellense,* *F. poae*	Céréales, fruits ensilages, fourrages	Répartition mondiale. Surtout en Europe

1.3. L'espèce *Fusarium graminearum*, agent causal de la fusariose de l'épi de blé (FHB)

1.3.1. Origine et caractéristiques générales

Le complexe auquel appartient *Fusarium graminearum* apparait il y a environ 1 million d'années. Ayant évoluées plus tardivement, ces espèces disposent, actuellement, de tous les caractères ancestraux des *Fusarium* (O'Donnell *et al*., 2013). Ce complexe commence à être isolé et caractérisé à partir des années 1920-1930 (Dickson *et al*., 1930; Tu, 1930). Les données biogéographiques situent l'origine du complexe d'espèces de *Fusarium graminearum* au niveau de l'hémisphère sud et de l'Asie. Les échanges commerciaux des céréales et les changements climatiques ont facilité la dispersion de *F. graminearum* en Asie, en Amérique du Nord et en Europe. Cela a entrainé sa réémergence sur tous ces continents. Les différentes espèces au sein du complexe d'espèces *Fusarium graminearum* semblent donc avoir évoluées par spéciation allopatrique, c'est-à-dire que deux populations, initialement interfécondes ont donné, par isolement géographique, deux espèces différentes. *F. graminearum* est maintenant présent sur tous les continents où le blé est cultivé (Wang *et al*., 2011). Il est responsable de la fusariose chez les céréales, particulièrement le blé, l'orge et le maïs.

Quand les conditions environnementales lui sont défavorables (peu de ressources nutritionnelles, stress), il peut développer un mode de survie en formant des structures de conservation appelées périthèces (Cavinder *et al*., 2012). Les périthèces sont constitués de mycélium initial condensé qui donne naissance aux hyphes ascogènes, d'une paroi externe dense et résistante, de paraphyses (mycélium stérile qui occupe le centre du périthèce jusqu'au développement des asques), et des asques contenant les ascospores de forme plus ovoïdes (Trail and Common, 2000).

1.3.2. Le cycle d'infection de *F. graminearum* sur le blé

Le cycle de vie de *F. graminearum* en interaction avec les céréales, et en particulier le blé, est complexe, avec une phase de croissance et une phase de conservation. L'attaque a souvent lieu au stade début épiaison-floraison (Figure 1). Le cycle d'infection de *F. graminearum* (Figure 2) commence avec la présence d'hyphes fongiques dans les débris des végétaux (résidus de la culture précédente), qui vont être capables d'infecter les grains au moment du semis (fonte des semis) ou les racines des plantules, puis coloniser la tige (fusariose du collet). Puis, au moment de la floraison des épis, les conidies, transportées par le vent vont être capable d'infecter le grain, et être responsables de la fusariose des épis et de la contamination des grains par les mycotoxines.

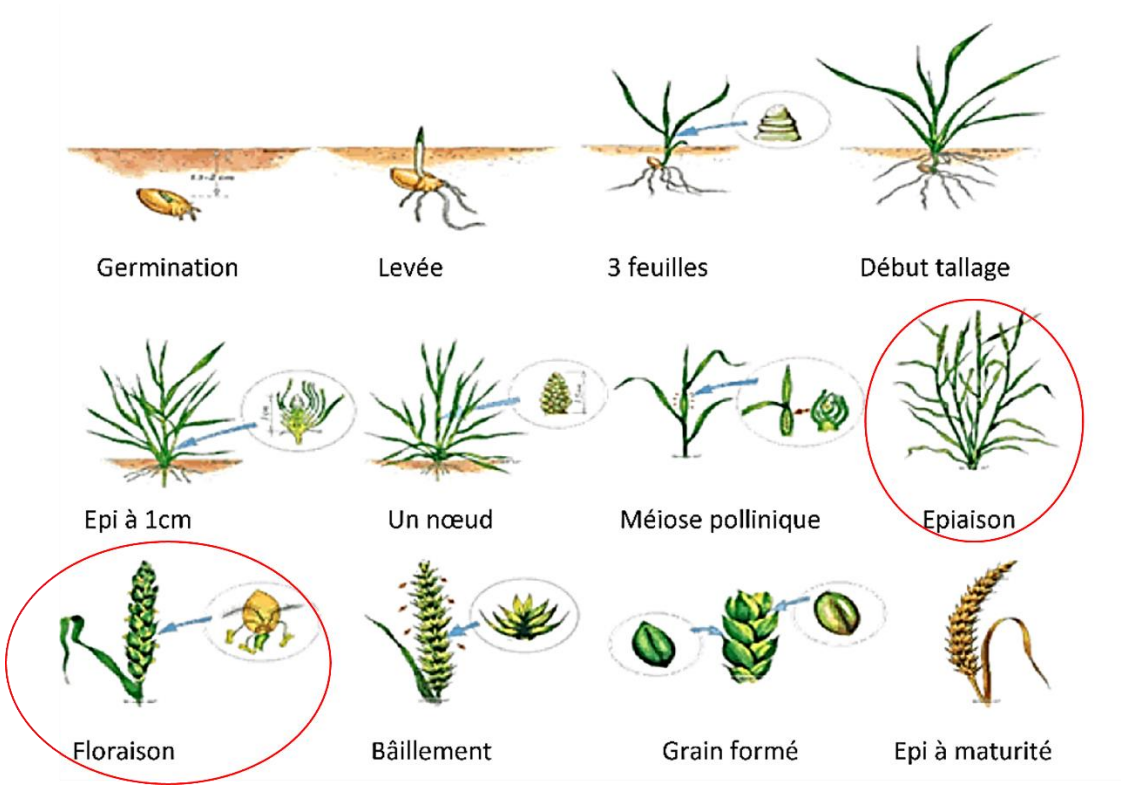


Figure 1 : Les différents stade de développement du blé (du semis à la maturation), en cercle rouge, les stades propices à l'attaque par *F. graminearum* pour causer la fusariose de l'épi (son cycle de développement est dans la Figure 2)

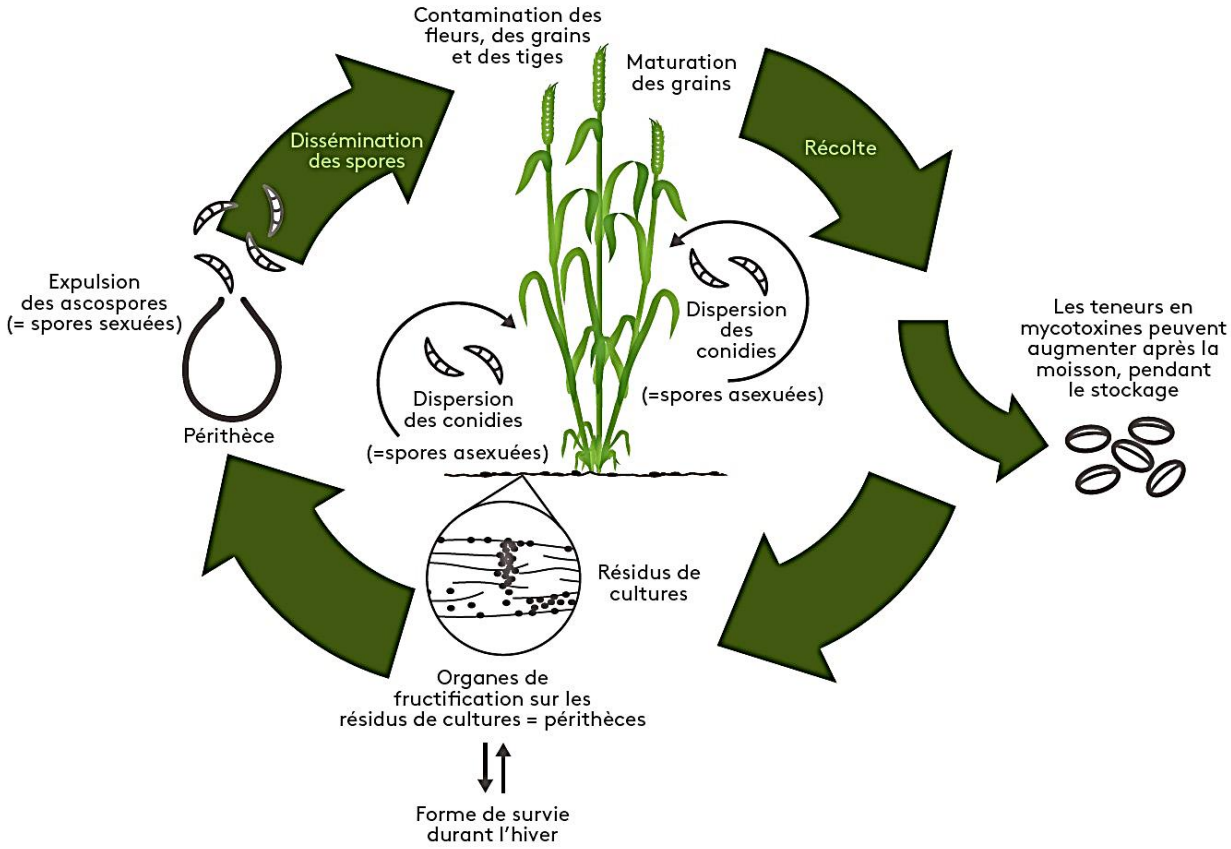


Figure 2 : Le cycle de vie du champignon pathogène *Fusarium graminearum* en interaction avec le blé, *Triticum* spp (Http://campaigns.adama.com/france/fr/info-fusariose/).

1.3.3. Les différentes étapes de colonisation du blé par *F. graminearum*

Fusarium graminearum est un pathogène hémibiotrophe c'est-à-dire qu'il peut coloniser son hôte sur une longue période sans apparition de symptômes, suivie d'une nécrose tissulaire massive et d'une augmentation rapide de la biomasse (Kazan *et al.*, 2012; Stephens *et al.*, 2008). Son cycle d'infection débute lorsque les conditions environnementales propices à son développement sont réunies. Le premier inoculum fongique qui va infecter le blé provient des débris de végétaux contaminés. Au début du printemps, grâce aux températures qui augmentent couplées à un taux d'humidité croissant, il va y avoir un développement et une maturation des asques (organes renfermant les ascospores). Une fois arrivée à maturité, ces asques vont éclater et permettre aux ascospores de se disséminer à l'aide du vent et de la pluie, mais aussi des insectes, vers la plante hôte (Goswami and Kistler, 2004).

Les spores ainsi déposées sur les tissus germent et pénètrent les épillets par des blessures, des ouvertures naturelles ou l'espace vide entre le paléa et le lemme de l'épillet. Les hyphes commencent à se développer de manière non-ramifiée sur la surface des glumes et dans la cavité florale dans les 12 heures suivant l'inoculation, et entrent fréquemment en contact avec les stomates (Pritsch *et al.*, 2000).

Une fois le pathogène entré dans l'organisme, il va dans un premier temps avoir un mode de vie biotrophe et continuer sa progression de manière asymptomatique entre les cellules pendant 20 à 70 heures.

C'est par la suite qu'il va pénétrer dans les cellules en déployant des hyphes épais, non ramifiés, dans les anthères et l'ensemble de l'ovaire, et le rachis est colonisé via l'ovaire. Cette phase conduit à une mort cellulaire et une nécrose tissulaire par accumulation de mycotoxines et une croissance intracellulaire, lui permettant de progresser rapidement à travers le système vasculaire et notamment le phloème pour envahir d'autres épillets adjacents, principalement vers le bas de l'épis puis adopter un mode de vie nécrotrophe (Hallen-Adams *et al*., 2011). La production de mycotoxines est connue pour être un facteur de virulence important ainsi, lorsque sa biosynthèse est supprimée, la virulence de *F. graminearum* est réduite (Pestka, 2010). La synthèse des mycotoxines est stimulée par certains composés de défense de la plante, tels que le peroxyde d'hydrogène ou les polyamines connues pour être accumulées dans les plantes attaquées par les pathogènes (Boedi *et al*., 2016).

Différents mécanismes impliqués dans la virulence de *F. graminearum* ont été décrits en fonction des tissus infectés par le pathogène. Les mycotoxines ne semblent pas être impliquées dans les premiers stades de l'infection mais les gènes de biosynthèse du déoxynivalénol sont activés lors de la dispersion du pathogène des épis infectés vers les épis non infectés. Le rachis, axe central des fleurs disposées en épi, va en effet constituer une barrière à la dispersion du pathogène. Ce dernier va activer par conséquent la production de mycotoxines pour outrepasser cette barrière, mais les mécanismes sont encore aujourd'hui inconnus (Brown *et al*., 2010; Kazan *et al*., 2012; Leonard and Bushnell, 2003). De même, le pathogène est aussi capable d'infecter le collet ou les racines, mais une fois encore les mécanismes mis en jeu lors de l'infection ne sont, à notre connaissance, pas encore connus.

2. Les mycotoxines

2.1. Historique

Le terme mycotoxine provient du grec ancien « *mukês* » : champignon et « *toxikos* » : poison. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires potentiellement toxiques, pour notre santé, produits par certains champignons filamenteux (Bian *et al*., 2023; Malir *et al*., 2023). L'interaction entre l'Homme et les mycotoxines a une longue histoire. Les mycotoxines sont apparues dans les réserves alimentaires humaines à peu près à l'époque où l'humanité a commencé à cultiver, récolter et stocker ses productions d'une saison à l'autre, il y a probablement 10 000 ans. Les moisissures étaient souvent considérées comme des souillures désagréables des denrées alimentaires. Pendant des siècles, plusieurs épidémies signalées dans l'histoire humaine ont été attribuées à la consommation d'aliments moisis mais elles

sont passées presque inaperçues. Historiquement, l'ergotisme est l'une des plus anciennes mycotoxicoses connues, puisqu'elle a sévi entre les VIIIème et XVIème siècles. En effet, l'agent causal *Claviceps purpura* synthétise l'ergotamine, une toxine mortelle responsable de plusieurs catastrophes au Moyen Age. Ainsi, la maladie appelée « le mal des ardents » causée par la consommation de seigle contaminé par des alcaloïdes produits par *Claviceps purpurea* a provoqué la mort de plusieurs milliers de personnes en Europe (van der Linde *et al.*, 2016).

En 1900, au Japon, la consommation de « riz jaune » contaminé par la citréoviridine produite par une espèce de *Penicillium (Penicillium citreonigrum)* a entrainé de très graves intoxications notamment hépatiques. L'ATA (aleucie toxique alimentaire) causée par des trichothécènes produits par *Fusarium sporotrichioides* a tué des milliers d'hommes à l'Est de la Russie entre 1942 et 1947 (Pitt and Miller, 2017; Reboux, 2006). Il a été suspecté que l'agent causal soit la toxine T-2 dès 1950. Or, ce n'est que 25 ans plus tard que cela a été confirmé (Pitt and Hocking, 1997).

En fait, l'étude des mycotoxines n'a débuté que dans les années 1960 avec la découverte des aflatoxines produites par *Aspergillus flavus,* responsable de la mort de près de 100 000 dindes près de Londres (Bennett and Klich, 2003). En Angleterre (Londres), des élevages de dindons étaient atteints d'une grave intoxication appelée maladie X des dindons « Turkey-X Disease », provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachides provenant du Brésil. Les symptômes étaient la perte de l'appétit, la faiblesse des ailes, la léthargie et puis la mort brutale. Des études, effectuées *a posteriori,* ont révélé que ces tourteaux étaient contaminés par *Aspergillus flavus* (Adams and Moss, 2007; Davis et al., 1975). Par la suite, les recherches ont montré qu'il y avait l'existence de quatre groupes d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) dont la forme B1 est considérée comme la mycotoxine la plus cancérigène connue dans le monde. Depuis cette époque, les champignons filamenteux ont fait l'objet d'une vague de recherches et de publications.

Aujourd'hui, les mycotoxines sont définies comme des composés chimiques non-protéiques de faible poids moléculaire (0,3-0,7 kDa) et thermostables, qui sont sécrétés par le métabolisme secondaire de certains champignons pathogènes avant et après le stockage des aliments, et qui présentent des propriétés toxicologiques potentiellement nocives pour les organismes, parfois même à faibles doses (Bennett and Klich, 2003; Rashad *et al.*, 2023). Leur petite taille et leur faible solubilité dans l'eau les rendent particulièrement et résistantes aux traitements thermiques (Shi *et al.*, 2023).

2.2. Les principales mycotoxines

2.2.1. Classification et toxicité

La majeure partie des mycotoxines comporte des hétérocycles insaturés présentant des doubles liaisons

carbonées dans leur structure, à l'origine de leurs propriétés toxiques et carcinogènes (Bennett and Klich, 2003). Elles ne forment pas un groupe chimique homogène mais sont classées en fonction des composés desquels elles sont issues (Ostry *et al.*, 2017; Steyn, 2012; Ülger *et al.*, 2020).

- Les alcaloïdes de l'ergot du seigle, l'Acide aspergillique, la Roquefortine, les Sporidesmines, l'Acide cyclopiazonique, la Slaframine, la Tryptoquivaline et la Gliotoxine font partie des dérivés des acides aminés.
- Les Ochratoxines, les Aflatoxines, la Zéaralénone (ZEN), la Stérigmatocystine, la Citrinine, la Patuline et les Rubratoxines sont issues de la métabolisation des polycétoacides (polyacétates).
- La Toxine T2, le Déoxynivalénol (DON), la Fusarénone, les Roridines ou encore les Verrucarines sont des dérivés des terpènes.

Leurs effets toxiques sur la santé des organismes vivants sont variés (Tableau 3). On peut distinguer quatre modes de toxicité : aiguë, chronique, mutagénique et tératogénique. Certaines toxines sont nocives pour le foie, comme les Aflatoxines, quand d'autres sont immunotoxiques, hématotoxiques, néphrotoxiques ou encore neurotoxiques. D'autres se révèlent être dermo-nécrosantes (Trichothécènes) ou oestrogéniques (Zéaralénone). Elles peuvent avoir des effets toxiques immédiats (mycotoxicose aiguë) mais les effets d'une exposition répétée à de faibles doses (exposition chronique) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires du consommateur et du pouvoir de rémanence de ces toxines (Reboux, 2006).

Une grande partie de ces toxines sont reconnues ou soupçonnées d'être cancérogènes (ANSES, 2009). Les toxines cancérogènes sont classées selon les groupes établis par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) : le groupe 1 **(**l'agent est *cancérogène* pour l'Homme) ; le groupe 2A (l'agent est *probablement cancérogène* pour l'Homme) ; le groupe 2B (l'agent est *peut-être cancérogène* pour l'Homme) ; le groupe 3 (l'agent est *inclassable quant à sa cancérogénicité* pour l'HOMME) ; le groupe 4 : l'agent *n'est probablement pas cancérogène* pour l'Homme).

Parmi les principales mycotoxines, les Aflatoxines ont été classées dans le groupe 1 , les fumonisines et l'OTA appartiennent au groupe 2B tandis que les trichothécènes, la zéaralénone et la patuline sont considérées comme inclassables dans le groupe 3 (Ostry *et al.*, 2017).

Tableau 3 : Mécanismes d'action et effets identifiés des principales mycotoxines (ANSES, 2009).

Toxines	Toxicité	Mécanismes d'action
Aflatoxines	Hépatotoxicité Génotoxicité Immunotoxicité Cancérogénicité	Formation d'adduits à l'ADN Peroxydation lipidique Conjugaison à la Glutathion-transférase
Ochratoxines	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Modification de la synthèse protéique Inhibition de la production d'ATP Détoxification par les peptidases
Fumonisines (FUM)	Neurotoxicité Hépatotoxicité, Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse des céramides Altération du cycle cellulaire Action sur le rapport Sphingosine/Sphinganine
Zéaralénone (ZEN)	Toxique pour la reproduction Toxique pour la fertilité	Action oestrogénique Conjugaison à la glucuronyltransférase Bio-activation par des déshydrogénases
Alcaloïdes de l'ergot	Cancérogénicité Génotoxicité Toxicité vasculaire	Action dopaminergique Effets vasoconstricteurs Effets ocytociques
Trichothécènes	Hématotoxicité Toxicité cutanée Immunomodulation	Altération des immunoglobulines Modification de la synthèse protéique Induction de l'apoptose des cellules immunitaires
Patuline	Mutagenèse Immunotoxique Neurotoxique	Inhibition indirecte de nombreuses enzymes (ADN et ARN polymérases)

2.2.2. Occurrence et règlementation

A partir des cultures de légumes ou de céréales, les mycotoxines peuvent être directement absorbées par les organismes lors de l'ingestion des produits bruts ou transformés. Les plantes peuvent également servir de nourriture aux animaux qui, à leur tour, pourront contaminer l'homme, par la production de viande ou de lait, que l'aliment soit transformé ou non, ce qui complexifie encore les liens entre les mycotoxines et la chaîne alimentaire. La diversité de producteurs des mycotoxines et de leurs hôtes ainsi que leur stabilité, ont permis la dissémination de ces molécules à travers le monde. Elles

n'épargnent aucune zone de la planète. Il est estimé qu'environ 25% des cultures vivrières dans le monde sont contaminées par les mycotoxines (Eskola *et al.*, 2020). De plus, les réseaux dynamiques de dissémination couplées aux évolutions du climat ont contribué à de nombreuses émergences et réémergences de toxines dans plusieurs zones géographiques à travers le monde.

Depuis 2004, Biomin, pionnier de la gestion des risques liés aux mycotoxines, réalise chaque année une enquête pour suivre les contaminations par les mycotoxines sur divers échantillons agro-alimentaires à travers le globe. La dernière étude compile les résultats d'analyse du programme (World Mycotoxin Survey : Impact 2021) avec plus de 21700 échantillons prélevés dans 79 pays du monde (figure 3). Les résultats montrent qu'en 2020, les mycotoxines les plus répandues dans le monde sont les mycotoxines de *Fusarium* : Déoxynivalénol (DON) (65 %) et Fumonisines (FUM) (64 %), suivies par la Zéaralénone (ZEN) (48 %).

L'Amérique du Nord a enregistré un risque élevé (77%) lié aux mycotoxines avec 5 mycotoxines présentes à des concentrations moyennes supérieures au seuil de risque, parmi lesquelles le DON et les FUM sont les plus fréquentes. Il semble donc qu'un risque grave soit présent en Amérique du Nord. En Amérique centrale, le risque est plus élevé que dans le Nord (87%), le DON et les FUM étant toujours les plus fréquents (dans 100 % et 76 % des échantillons pour le DON et les FUM respectivement). L'Amérique du Sud est classée à haut risque (67%) en raison de la concentration moyenne supérieure au seuil de risque de trois mycotoxines : les FUM (incidence la plus élevée de 70 % des échantillons), suivies de la ZEN et du DON. De même, l'Europe est également classée à haut risque (49%) en raison de la présence de quatre mycotoxines (DON, FUM, ZEN et toxine T-2) dont les concentrations moyennes sont supérieures au seuil. En Asie et au Moyen-Orient, toutes les mycotoxines, à l'exception de la toxine T-2, ont montré une incidence élevée sur les échantillons testés. L'Asie a enregistré les concentrations les plus élevées de DON (dans les farines de maïs chinoises) et d'Aflatoxines. L'Afrique, y compris l'Afrique du Sud, est confrontée à un risque élevé lié aux mycotoxines avec la ZEN, le DON et les FUM dont la prévalence est assez élevée et dont les concentrations moyennes sont supérieures aux seuils. Cette répartition dépend principalement des variétés d'échantillons (maïs, blé, riz, cacao, seigle, raisin, pommes, etc.) dans les différents pays. Plusieurs champignons ne se développent que sur des plantes spécifiques nécessitant des conditions climatiques particulières. La répartition des groupes de mycotoxines est donc liée au climat et, par conséquent, à des zones géographiques définies. Cependant, l'augmentation du commerce extérieur a conduit à une invasion globale qui est indépendante du climat et des barrières géographiques des mycotoxines.

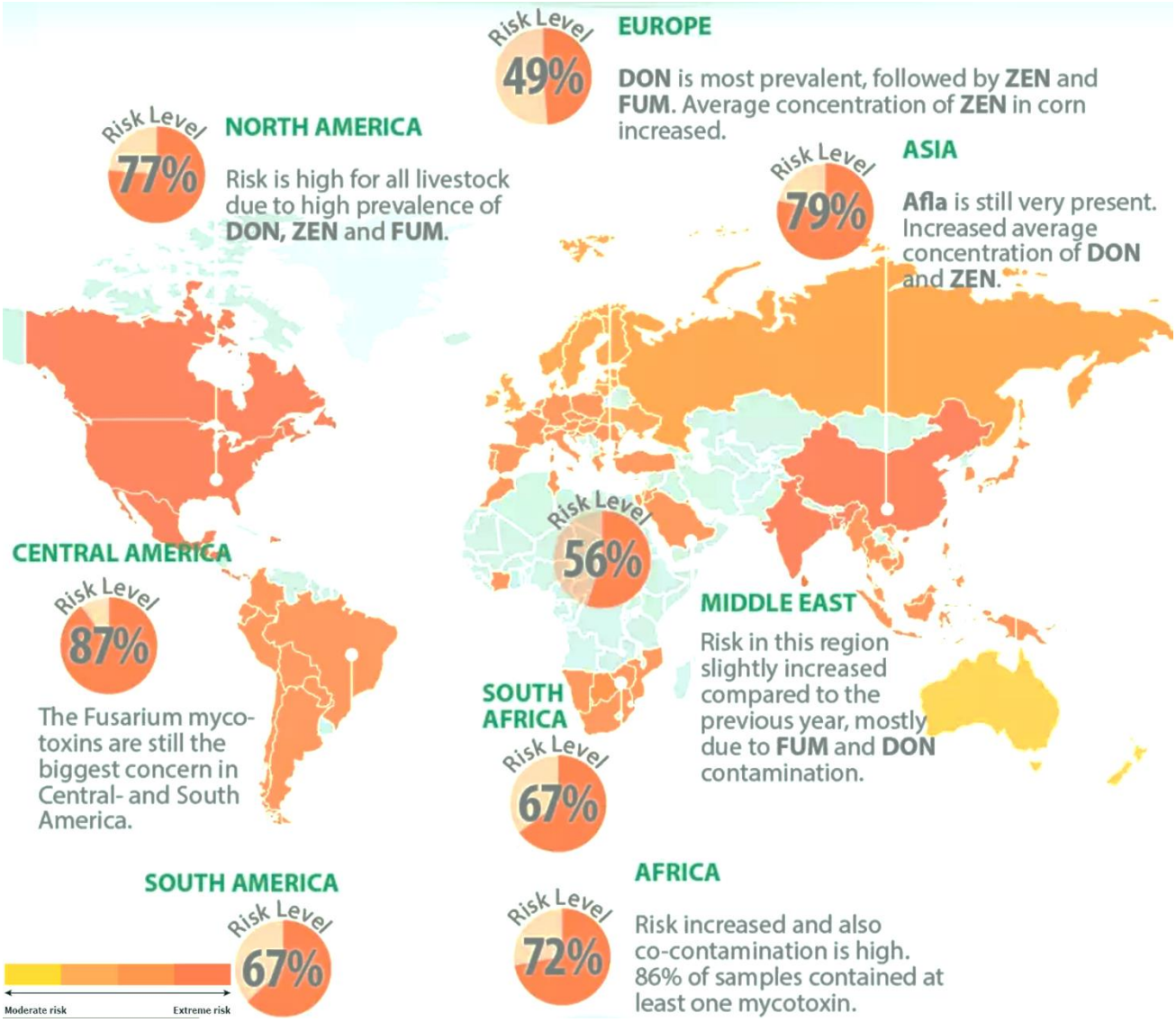


Figure 3 : Carte de distribution et cooccurrence des mycotoxines à travers le monde (Mycotoxin Survey report 2021 by biomin.net).

Compte tenu des effets sur la santé humaine et animale induits par les mycotoxines, leurs teneurs dans les aliments sont règlementées au niveau mondial (Comité mixte FAO-OMS d'experts des additifs alimentaires, Codex Alimentarius) et européen (RÈGLEMENT (UE) 2023/915 DE LA COMMISSION du 25 avril 2023 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) no 1881/2006). L'objectif de ces normes est de protéger la santé publique en garantissant la sûreté sanitaire des produits alimentaires et en maintenant les contaminants à des niveaux toxicologiques acceptables dans divers produits plus ou moins exposés à ces contaminants. En plus de fixer les seuils règlementaires, la commission européenne de régulation permet d'empêcher la mise sur le marché de produits dépassant les seuils fixés, en tant que tels, après avoir été mélangés à d'autres denrées alimentaires, ou encore utilisés

comme ingrédients dans d'autres denrées alimentaires. Les niveaux autorisés de mycotoxines dans les produits alimentaires courants réglementés par l'UE sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Concentrations maximales autorisées (CMA) des mycotoxines réglementées dans l'alimentation humaine (RÈGLEMENT (UE) 2023/915 DE LA COMMISSION du 25 avril 2023).

Toxines	Denrées concernées	CMA (µg/kg)
Aflatoxine B1	Arachide	2 à 8
	Céréales	2 à 5
	Épices	5
	Préparations pour enfants en bas âge	0,1
Aflatoxines B1, B2 G1, G2	Arachide	4 à 15
	Céréales	4 à 10
	Épices	10
Aflatoxine M1	Lait	0,05
	Préparations pour enfants en bas âge	0,025
Ochratoxine A	Céréales brutes	5
	Produits céréaliers et dérivés	3
	Préparations pour enfants en bas âge	0,5
	Raisins secs	8
	Café	3 à 5
	Vins, jus de raisin, moûts	2
Déoxynivalénol	Céréales (sauf blé, maïs et avoine)	1250
	Blé dur, avoine	1750
	Maïs brut	1750
	Farines et semoules de céréales	750
	Pains, pâtisseries, biscuits, snacks	500
	Pâtes sèches	750
	Céréales pour alimentation infantile	200
Zéaralénone	Céréales et maïs	100 à 200
	Farines autres que maïs	75
	Farines et semoules de maïs	200
	Pains, pâtisseries, biscuits, snacks	50
	Aliments infantiles à base de céréales et maïs	20
Fumonisine B1	Maïs	2000
	Farines, semoules et huiles de maïs	1000
Fumonisine B2	Aliments à base de maïs	400
	Alimentation infantile à base de maïs	200
Patuline	Jus de fruits, boissons à base de pomme, compotes	25 à 50
	Jus de fruits, boissons à base de pomme pour enfants en bas âge	10

2.3. Les conditions climatiques impactant le risque de présence de mycotoxines à travers le monde

Les multiples occurrences de mycotoxines continuent d'être une préoccupation mondiale. Les changements climatiques sont soupçonnés d'être responsable de changement de leur répartition (Botana and Sainz, 2015; Fapohunda and Adewunmi, 2019; Streit *et al.*, 2013; Kovalsky, 2014). La production de mycotoxines est fortement dépendante des conditions climatiques (facteurs environnementaux), notamment de la température et de l'humidité (souvent rapportée à l'activité de l'eau). Chaque espèce fongique possède une température optimale de croissance, d'où une large dispersion géographique des mycotoxines (De Boevre *et al.*, 2012; Yazar and Omurtag, 2008). La température optimale moyenne de production est comprise entre 20 et 30°C. L'humidité du sol influence également la production et la présence de mycotoxines. Il est estimé que la production est favorisée par une humidité élevée (Manstretta and Rossi, 2016; Nazari *et al.*, 2018; Peter Mshelia *et al.*, 2020). Au champ, la contamination intervient généralement dans des conditions chaudes et humides en climat tropical et subtropical ou fraîches et humides en climat tempéré, en l'absence d'utilisation de fongicide. Dans le cas d'une contamination post-récolte, la mycotoxine peut avoir été produite en raison de mauvaises conditions de récolte ou de stockage avec une forte humidité (Magan *et al.*, 2011, 2010; Neme and Mohammed, 2017).

La température conditionne le développement de la flore fongique et surtout sa vitesse de croissance. Elle peut soit inhiber les réactions enzymatiques par dénaturation des enzymes en cas d'élévation, soit provoquer la diminution de la vitesse des activités enzymatiques en cas de baisse. La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 à 35°C. La croissance des *Fusarium* est plus favorisée dans les climats tempérés à des températures comprises entre 26 et 28°C, tandis que les *Aspergillus* prolifèrent mieux sous des températures chaudes (Gizachew *et al.*, 2019). Certaines espèces sont psychrophiles ou psychrotolérantes et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les champignons du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4ºC à 31ºC avec un optimum à 12ºC (Nguyen Van Long *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2020).

L'augmentation de la température, le stress dû à la sécheresse et l'augmentation de la concentration du CO_2 atmosphérique sont les principaux facteurs climatiques qui ont un impact sur la répartition des mycotoxines dans le monde. Avec les changements climatiques, il y aurait un impact sur la distribution géographique ou le cycle de vie des pathogènes qui favorisent la contamination fongique des cultures (Gruber-Dorninger *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2017; Moretti *et al.*, 2019; Van der Fels-Klerx *et al.*, 2021). En raison de l'adaptation de certaines espèces de *Fusarium*, il est constaté qu'elles sont plus

abondantes dans certains environnements, climats ou régions géographiques. Des études mycogéographiques ont rapporté que le complexe *Fusarium* « rouge », c'est-à-dire *F. avenaceum*, *F. culmorum* et *F. sporotrichioides*, est plus fréquent dans les régions à climat plus frais (Reyneri, 2006; Vujanovic and Labrecque, 2008; Yergeau *et al.*, 2006). Cependant, *F. graminearum* est fréquemment trouvé dans les climats chauds et secs et une température optimale entre 29°C et 30°C est nécessaire pour la production massive de macroconidies et de périthèces (Doohan *et al.*, 2003). L'aflatoxine B1 devrait être plus fréquente dans le maïs en Europe en raison d'un réchauffement de 2°C d'ici 100 ans (Battilani *et al.*, 2016). Toujours en Europe, les projections de modèles simulant les conditions météorologiques au cours de la période 2013-2050 appliquées par van der Fels-Klerx, (2014) et Olesen *et al.*, (2012) ont montré que le changement climatique devrait se traduire par un doublement de la contamination par le DON dans le blé. Vaughan *et al.*, (2014) ont constaté qu'un niveau de CO_2 deux fois supérieur au niveau actuel augmentait la sensibilité du maïs à la colonisation par *F. verticillioides* mais le niveau de fumonisine B1 ne serait pas proportionnel à l'augmentation de la biomasse. Cependant, la production de fumonisines régulée par fum1, un gène clé dans la voie de biosynthèse des fumonisines, a été signalée comme étant significativement affectée par les changements de facteurs environnementaux (Marin *et al.*, 2013). Une surveillance constante, un plan de prévention et une recherche continue sur la prévention et la gestion de la contamination par les mycotoxines sont donc indispensables.

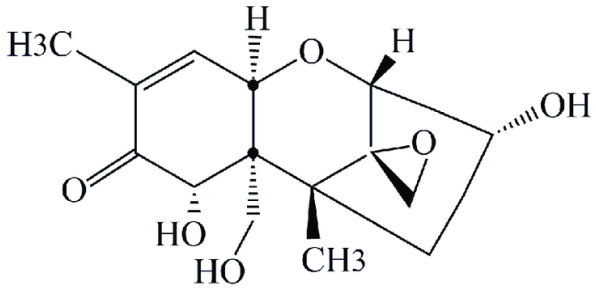
2.4. Les mycotoxines produites par *F. graminearum* (Déoxynivalénol et Zéaralénone)

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites principalement par des espèces appartenant aux genres *Fusarium* notamment *Fusarium graminearum.* Plus de 190 molécules ont été identifiées comme appartenant à ce groupe de mycotoxines notamment le déoxynivalénol (DON) qui est une molécule à poids moléculaire 296,31 g/mol (Figure 4). Le DON, également appelé vomitoxine du fait des symptômes engendrés, est le trichothécène le plus important en termes d'exposition humaine (Desjardins, 2006; Richard, 2007). Son accumulation dans l'organisme humain ou animal peut engendrer une nécrose et une hémorragie pendant les processus de régénération du sang dans la moelle osseuse et la rate. Il peut être tératogène, neurotoxique, embryotoxique et immunosuppressif (Pestka, 2007). Les signes de pathologie sont : la perte de poids, la perte d'appétit, les vomissements, la diarrhée, l'avortement et la mort. L'immunosuppression peut être très importante chez les animaux intoxiqués (Proctor *et al.*, 2002). Les DON acétylés peuvent engendrer une toxicité plus forte car ces toxines sont plus rapidement absorbées dans l'intestin (Gerez *et al.*, 2015).

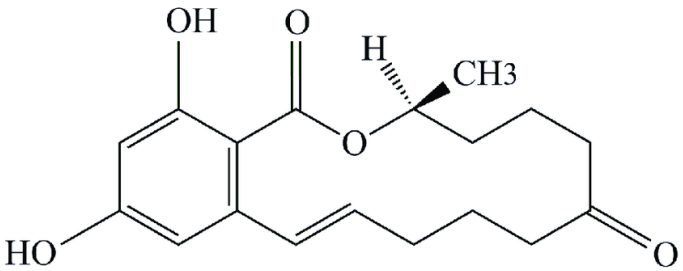
La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine de structure oestrogénique non-stéroïdique produite

principalement, dans les champs de blé et de maïs, mais aussi d'orge et d'avoine, par des espèces du genre *Fusarium* tel que *Fusarium graminearum* (Bennett and Klich, 2003). Sa synthèse dépend fortement des conditions environnementales et est favorisée par une humidité élevée et une faible température. Elle est majoritairement produite dans les zones tropicales et/ou tempérées (Magan and Olsen, 2004; Ripert, 2013). La zéaralénone est connue pour ses effets oestrogéniques à l'origine d'infertilité, de diminution du taux de la testostérone sérique et du nombre des spermatozoïdes, de réduction du taux de grossesse et des changements des taux de progestérone (Shier *et al*., 2001). Elle se lie compétitivement aux récepteurs d'œstrogène. La première description des symptômes cliniques qu'elle provoque a été effectuée en 1927 alors que la toxine, elle-même, n'avait pas été identifiée. Ce n'est qu'en 1966 qu'elle a été nommée et décrite structurellement (Desjardins, 2006; Gaumy *et al*., 2001).

Elle peut également causer des complications hépatotoxiques, hématotoxiques et des effets génotoxiques tels que l'induction des micronoyaux, des aberrations chromosomiques, des cassures des brins d'ADN et la formation des adduits (Abbès *et al*., 2006; Čonková *et al*., 2001).



Deoxynivalenol



Zearalenone

Figure 4 : Structures chimiques du Déoxynivalénol et de la Zéaralénone (Kostić *et al*., 2019)

II. Les moyens de lutte contre les phytopathogènes fongiques et leurs mycotoxines

Les origines de la contamination des aliments par les moisissures et leurs mycotoxines sont multiples. La contamination des cultures par les mycotoxines peut être contrôlée en empêchant la prolifération fongique pendant la croissance des cultures. Toutefois, cette stratégie ne suffit souvent pas et il est nécessaire d'intervenir tout au long de la chaîne alimentaire. D'abord, il faut éviter l'infestation par les champignons au champ (méthode préventive), pour ensuite intervenir en cas d'infestation des cultures par les champignons et leurs mycotoxines et enfin décontaminer lorsque les récoltes s'avèrent contaminées par les mycotoxines (méthode curative). La première approche comprend un assainissement approprié, la préparation du sol et de l'eau, la rotation des cultures et l'amélioration des variétés de plantes et des stratégies de biocontrôle et la lutte chimique (Broydé and Doré, 2013) (Figure 5).

L'utilisation des pesticides chimiques a permis depuis 50 ans une augmentation considérable des rendements ainsi qu'une régularité accrue de la production (Gerbore *et al.*, 2014). Cependant, les pesticides chimiques utilisés pour lutter contre les agents pathogènes des plantes sont souvent connus pour les effets négatifs qu'ils peuvent avoir sur l'environnement et les consommateurs. Cette question est devenue un sujet de préoccupation croissante et la pression de la société pour une alimentation saine, exempte de résidus de pesticides, oblige la recherche à développer rapidement des méthodes respectueuses de l'environnement (Gerbore *et al.*, 2014; Shternshis *et al.*, 2015). Un effort majeur est engagé depuis quelques années pour proposer des solutions alternatives efficaces notamment le plan Ecophyto 2018 qui a été lancé fin 2007 pour tenter de réduire de moitié la dépendance des exploitations agricoles aux produits chimiques phytopharmaceutiques d'ici 2018. L'objectif de réduire de 50 % l'utilisation de pesticides faisait partie des efforts majeurs. Malgré cet objectif ambitieux, la détermination du gouvernement, les efforts des chercheurs et des agriculteurs qui devaient permettre le changement, l'objectif n'a pas été atteint. Cela a conduit la mise en place du plan Ecophyto II qui prolonge le premier plan jusqu'en 2025.

Parmi les stratégies de gestion des pathogènes, il y a le biocontrôle. Les techniques de contrôle biologique employées en agriculture sont diverses et variées et l'une d'entre elles est l'utilisation de microorganismes antagonistes en tant qu'agents de biocontrôle. En outre, il existe des pratiques agronomiques non chimiques, telles que la rotation des cultures, qui contribuent à limiter le développement des pathogènes fongiques, l'utilisation d'amendements organiques. Ces solutions biologiques offrent des possibilités de substitution pour le contrôle des maladies fongiques et des mycotoxines avec de faibles risques pour les consommateurs et l'écosystème (Rodríguez *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2021).

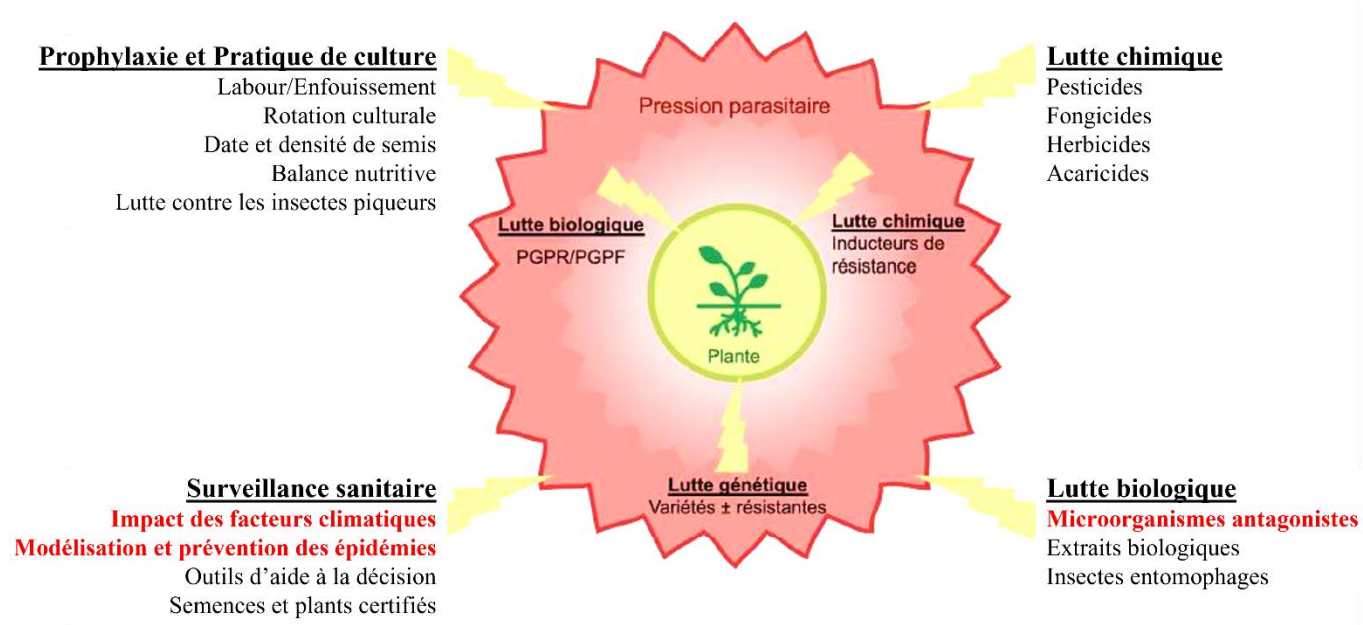


Figure 5 : Récapitulatif des moyens de lutte contre les pathogènes de plante permettant d'agir sur la plante ou sur la pression parasitaire (adapté de Pellan, 2020).

Les pistes exploitées dans cette étude sont en rouge dans la figure. Elles sont présentées dans ce qui suit avec les autres stratégies de lutte contre les pathogènes en dehors des pesticides chimiques.

1. La lutte intégrée dans le contrôle de *Fusarium graminearum*

1.1. Les pratiques culturales adaptées

Les pratiques culturales adaptées dans les agrosystèmes peuvent être des alternatives au recours aux produits phytosanitaires dans la lutte contre les pathogènes. D'abord, il est possible d'utiliser des semences de bonne qualité, exemptes de moisissures, de parasites et de maladies avant d'être semées. La période de semis est un élément clé de la protection des cultures car elle a un impact indirect sur les attaques fongiques des cultures. En effet, la date de semis, couplée aux conditions météorologiques, déterminent la date de floraison. Éviter que la floraison coïncide avec la période de libération des spores du champignon peut contribuer à réduire les infections. Il convient donc d'éviter les températures élevées et le stress dû à la sécheresse pendant la phase de développement et de maturation des semences. Un manque d'eau résultant d'un stress de sécheresse peut faciliter la pénétration des moisissures et des spores fongiques dans les plantes par le biais des fissures sur les troncs des plantes (Bawden, 1991; Stone *et al.*, 2004).

Des techniques de culture appropriées peuvent réduire le risque de contamination fongique, étant donné que le principal réservoir d'inoculum fongique est constitué par les résidus des cultures précédentes. L'élimination des déchets agricoles constitue donc une prévention efficace de la contamination des nouvelles cultures. Le labourage contribue également à limiter la contamination par

les moisissures (Champeil *et al.*, 2004; Munkvold, 2003). Le précédent cultural et le choix des rotations de culture sont des facteurs importants qui déterminent le risque des maladies dues aux espèces du genre *Fusarium* sur le blé (Váňová *et al.*, 2008; Chellemi *et al.*, 2017). Des rotations avec des cultures non−céréalières permettent de diminuer l'incidence du pathogène au moment de la culture de céréales (Pirgozliev *et al.*, 2003). La rotation culturale, en plus de diminuer l'inoculum primaire de *Fusarium graminearum*, permet au sol une régénération en nutriments (nutrition azotée par exemple avec les légumineuses) et donc un sol de meilleure qualité pour les cultures suivantes (Beaudoin *et al.*, 2005).

1.2. La surveillance sanitaire avec la modélisation comme moyen de prévention

La nécessité d'assurer la qualité microbiologique et la sécurité sanitaire des produits alimentaires a stimulé l'intérêt pour l'utilisation des modèles mathématiques pour quantifier et prédire le comportement microbien (Lahlali *et al.*, 2005). Les épidémies de fusarioses sont fortement dépendantes du climat. De nombreux facteurs environnementaux peuvent être liés à des variations d'incidence des maladies. Ces facteurs peuvent être la température, l'humidité, le pH, la lumière ou encore la disponibilité en oxygène. Ils sont très importants pour le développement des pathogènes (Leplat *et al.*, 2013). Vu ce potentiel de sensibilité aux conditions environnementales et climatiques, différents outils d'aide à la décision ont été mis au point pour optimiser les traitements des pathogènes afin de prévenir les maladies du blé (De Wolf *et al.*, 2003; Raja *et al.*, 2018). La plupart des outils de prévision, issus de la modélisation, contre les fusarioses et mis à disposition des agriculteurs en France ont été élaborés à partir des données météorologiques aux champs, ainsi que sur des facteurs de risque associés à des pratiques culturales (Prandini *et al.*, 2009). Parmi les outils, figurent par exemple DONcast® (dédié à la gestion de la fusariose de l'épi et la mycotoxine DON dans les champs de blé), Taméo® (conçu par ARVALIS & Météo-France), Septo-LIS carto® (ARVALIS), ATLAS-xarvio FIELD MANAGER (BASF) et l'application Météus® (ISAGRI).

L'utilisation de la modélisation pour la prédiction des croissances fongique et leurs mycotoxines dans les cultures a un intérêt considérable en microbiologiste prédictive (Norlia *et al.*, 2020). Dans ce contexte, la prévision de la croissance et de la production de mycotoxines à l'aide de l'approche de modélisation prédictive peut être appliquée comme une étape clé de la gestion des risques pour garantir la sécurité des produits alimentaires. La température, l'activité de l'eau (a_w) et l'humidité ont un impact significatif sur la capacité de *F. graminearum* à se développer et à produire ses mycotoxines (Goh *et al.*, 2009).

Basés principalement sur la susceptibilité du cultivar, la taille de l'inoculum fongique et les conditions climatiques, plusieurs modèles mathématiques capables de prédire l'occurrence de fusarioses et/ou les

niveaux de contamination en DON ont été développés dans un certain nombre de pays comme l'Argentine, le Canada, l'Italie, les Pays-Bas, la Suisse ou encore les États-Unis (Moschini and Fortugno, 1996; Musa *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2003; van der Fels-Klerx, 2014; Van Der Fels-Klerx *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2022). Par conséquent, l'effet des différents paramètres sur le taux de croissance des champignons doit être étudié dans certaines conditions abiotiques qui peuvent simuler la situation pendant l'infection du blé afin que des stratégies d'intervention et de contrôle puissent être proposées pour minimiser le risque de mycotoxines. En revanche, la croissance fongique présente une variabilité intraspécifique moindre et les limites de croissance sont très similaires entre les souches de *F. graminearum* contrairement à la production de DON (Boutigny *et al.*, 2017). En effet, la capacité de *F. graminearum* à produire du DON varie en fonction de la diversité génétique de la souche, de l'origine géographique, du substrat et des conditions environnementales, ainsi, les modèles développés à l'aide d'une seule souche peuvent ne pas être représentatifs (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010).

Pour décrire l'effet de ces paramètres sur le taux de croissance fongique et la production de mycotoxines, une approche de modélisation en deux étapes est couramment utilisée. Le modèle primaire décrit les changements de la population fongique au fil du temps dans des conditions spécifiques, tandis que le modèle secondaire explique l'effet des facteurs environnementaux (par exemple, la température, l'humidité, l'a_w, le pH.) sur la réponse (par exemple, le taux de croissance, le taux de germination et la phase de latence.) qui est préalablement déterminée dans le modèle primaire (Nazari *et al.*, 2014).

1.2.1. Les modèles primaires de croissance applicables aux champignons

Les modèles primaires décrivent comment le nombre de microorganismes (pathogènes et non pathogènes) change au cours du temps sous l'effet des facteurs environnementaux (Marks, 2007). La croissance fongique implique la germination des spores puis la croissance des hyphes qui forment le mycélium. Les modèles de croissance les plus utilisés sont basés sur les mesures de diamètre ou de surface de la colonie, ce qui correspond à la technique la plus simple et reproductible pour obtenir des données. La croissance des champignons dans des substrats solides suit généralement un modèle constitué d'une phase de latence et d'une phase de croissance linéaire dans des conditions optimales et en absence de facteurs limitants (Shay *et al.*, 2022; Trinci, 1971). En conditions suboptimales, une phase stationnaire peut apparaitre lorsque les champignons arrêtent de croître (Gibson *et al.*, 1994) ou, dans le cas des études *in vitro*, les limites de la boite de Petri peuvent constituer une barrière. Ainsi, les modèles de croissance les plus utilisés sont le modèle linéaire, l'équation modifiée de Gompertz

(Zwietering *et al*., 1990) et le modèle de Baranyi and Roberts, (1994).

1.2.2. Les modèles secondaires de croissance applicables aux champignons

Les modèles secondaires décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur les principaux paramètres estimés à partir des modèles primaires (le taux de croissance, le taux de germination, la phase de latence). Peu d'études ont été réalisées sur l'application des modèles secondaires pour les données de croissance des champignons. Les modèles polynomiaux ont été les plus utilisés dans ces cas (Halouat and Debevere, 1997). Parmi les modèles secondaires, les plus utilisés sont : le modèle cardinal de Rosso (Rosso *et al*., 1993) qui a été plus tard modifié par Rosso and Robinson, (2001), le modèle de racine carrée de Ratkowsky *et al*., (1983), l'équation linéaire d'Arrhenius-Davey (Davey, 1989), le modèle de Gibson (Gibson *et al.,* 1994) et d'autres modèles polynomiaux.
En plus des modèles primaires et secondaires, des modèles tertiaires peuvent être appliqués. Un modèle tertiaire est défini comme étant une intégration des modèles primaires et secondaires dans une base de données (Xu *et al*., 2013). A ce jour, aucun modèle tertiaire n'a été appliqué pour prédire la croissance des champignons. Ils sont adaptés à prédire la croissance de quelques bactéries pathogènes.

1.2.3. Les modèles applicables aux cinétiques de production des mycotoxines

Comme pour la prédiction de croissance des champignons, les mycotoxines sont aussi importantes à prédire pour une meilleure gestion des risques. A présent, aucun modèle primaire généralisé n'est associé à la production de mycotoxines. Ces dernières années, plusieurs recherches relatives à la production de différentes mycotoxines dans des milieux synthétiques ou des substrats alimentaires ont été menées. Ces études quantifient généralement la production totale de mycotoxine par poids total de l'échantillon mais pas la production spécifique (liée au poids ou surface de colonie du champignon). L'augmentation de la concentration des mycotoxines au cours du temps est le résultat de l'augmentation de la biomasse des champignons additionnée à l'augmentation de la production spécifique de mycotoxines. Une modélisation appropriée devrait permettre l'estimation de la quantité de mycotoxine produite par poids de biomasse fongique ou par surface de colonie et unité de temps. Cela nécessite des approches de modélisation applicables en plusieurs étapes (primaire, secondaire et tertiaire si nécessaire).

Il y a peu d'études qui présentent des équations de modélisation secondaire de la production de mycotoxines. Quelques travaux ont été réalisés sur la cinétique de formation de toxines sous l'influence de différents facteurs environnementaux, mais peu ont appliqué des modèles primaires. Le temps nécessaire à la production d'OTA par des souches d'*Aspergillus* spp incubées à différentes a_w a

été étudié par modélisation en appliquant la régression linéaire multiple (Bellí *et al.*, 2004). Plus tard, la cinétique d'accumulation d'OTA par *A. carbonarius* sur milieu synthétique a été modélisé avec le modèle de Gompertz (Marín *et al.*, 2008). Le modèle d'Arrhenius (fonction de température) a été appliqué pour étudier l'effet de la température sur la production des aflatoxines dans des milieux solides (Pitt, 1993). Dans une étude faite par Baert *et al.*, (2012), l'accumulation de la patuline dans les pommes ou en fonction de la température et du pourcentage d'oxygène pendant le stockage a été modélisée en appliquant une équation polynomiale.

2. Le contrôle biologique : une solution prometteuse

Le biocontrôle est défini comme un ensemble de méthodes de protection des cultures basées sur le recours à des organismes vivants ou des substances naturelles. On distingue souvent quatre catégories d'approches, basées sur des macro-organismes (insectes, nématodes, etc.), des microorganismes (virus, bactéries ou champignons), des médiateurs chimiques (phéromones), ou des substances naturelles d'origine minérale, végétale ou animale (Daguerre *et al.*, 2014; Junaid *et al.*, 2013). L'intégration des produits de biocontrôle dans les pratiques agricoles, ainsi que d'autres technologies telles que les systèmes de surveillance des maladies et des insectes et les technologies d'application intelligente, permettra à nos systèmes agricoles de devenir de plus en plus durables et d'aider les écosystèmes du sol à retrouver un équilibre naturel. L'importance d'une vie microbienne équilibrée dans le sol fait l'objet d'une attention croissante. Les produits biologiques permettent de préserver, voire d'améliorer cet écosystème du sol. Différents types de ces produits sont vendus dans le commerce aujourd'hui. Il s'agit par exemple d'extraits de plantes et de microorganismes détectés à l'origine dans les sols, qui peuvent lutter contre les pathogènes par la compétition pour l'espace ou par l'excrétion de composés toxiques pour le pathogène fongique ou bactérien (Pellan *et al.*, 2021).

Les techniques de biocontrôle ne datent pas d'aujourd'hui, bien que le terme tel quel soit relativement récent. L'ail et le prêle des champs ont été utilisés comme moyen de lutte contre des pathogènes fongiques (Bach *et al.*, 2016; García-Núñez *et al.*, 2017; Shang *et al.*, 2019). Les exemples de lutte biologique dans des ouvrages scientifiques, quant à eux, datent de la fin du XIX^{ème} et du début du XX^{ème} siècle.

Selon l'IBMA (International Biocontrol Manufacturers Association), le marché du biocontrôle bénéficie d'une croissance régulière et continue depuis les années 2000. En 2021, ce marché représente 13% de la vente des produits de lutte contre les pathogènes en France, contre 8% en 2018. Il continue de croitre, sa hausse étant de 16% entre 2020 et 2021, atteignant ainsi un chiffre d'affaires de plus de 250 millions d'euros.

2.1. L'utilisation d'agents de contrôle biologique

L'utilisation d'agents de contrôle biologique permettrait de diminuer l'utilisation des produits chimiques et de promouvoir les différentes potentialités des microorganismes existants naturellement. Cette utilisation peut consister en l'utilisation d'organismes bénéfiques ou de leurs produits, tels que les métabolites, qui réduisent les agents pathogènes des plantes et leurs effets négatifs, et favorisent des réactions de défenses de la plante (Junaid *et al.*, 2013).

2.1.1. Les microorganismes de biocontrôle (BCA)

Les microorganismes sont un type d'agents de contrôle biologique utilisés dans la lutte contre les phytopathogènes fongiques (Tableau 5). Sont inclus dans cette dénomination les bactéries, les champignons et les virus. Ils représentaient, en 2021, 7% du chiffre d'affaires du marché du biocontrôle.

Plusieurs microorganismes de biocontrôle existent de nos jours et chacun est utilisé pour prévenir ou traiter une maladie spécifique ou plusieurs à la fois. Ils offrent un large éventail de modes d'action pouvant être séparé en deux types d'effets : l'antagonisme direct (comme la compétition pour les nutriments, les sites d'infection ou le parasitisme) et l'antagonisme indirect (promotion de la défense des plantes) (Fravel, 2005; O'Brien, 2017).

Des microorganismes d'intérêt pour le biocontrôle des pathogènes du sol ont été identifiés parmi les champignons, les actinomycètes et les bactéries (El-Katatny *et al.*, 2006). Dans ce sens, un certain nombre de produits commerciaux ont été homologués aux niveaux national et international à partir de différents antagonistes fongiques et bactériens (Junaid *et al.*, 2013; Legrand *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017). Plusieurs espèces de *Trichoderma* spp ont été largement utilisées comme agents fongiques antagonistes contre plusieurs phytopathogènes ainsi que comme stimulateurs de croissance des plantes (Woo *et al.*, 2023). Les agents de biocontrôle n'exterminent pas complètement les populations pathogènes de leurs plantes hôtes. Au mieux, on peut s'attendre à ce qu'ils ramènent leur densité à un niveau acceptable ou à ce qu'ils réduisent leur virulence et/ou leur potentiel reproductif (inhibition de la germination des spores) (Boro *et al.*, 2022).

Tableau 5 : Liste de quelques microorganismes ayant une activité avérée ou possible contre les pathogènes du sol et de leur statut (Adapté de http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2023/1021/oj).

Microorganismes	Catégorie visée	Statut au titre du règlement (CE) n° 1107/2009	Date d'approbation
Bacillus amyloliquefaciens MBI 600	*Fungi*	En attente	
Bacillus amyloliquefaciens strain FZB24	*Fungi*	En attente	
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum D747	*Fungi*	Approuvé	01/04/2015
Bacillus firmus I-1582	Nématodes	Approuvé	01/10/2013
Bacillus pumilus QST 2808	*Fungi*	Approuvé	01/09/2014
Bacillus subtilis str. QST 713	*Fungi*, Bactéries	Approuvé	01/02/2007
Coniothyrium minitans	*Fungi*	Approuvé	01/01/2004
Gliocladium catenulatum strain J1446	*Fungi*	Approuvé	01/04/2005
Purpureocilium lilacinum strain 251	Nématodes	Approuvé	01/08/2008
Phlebiopsis gigantea (several strains)	*Fungi*	Approuvé	01/05/2009
Pseudomonas chlororaphis strain MA342	*Fungi*	Approuvé	01/10/2004
Pseudomonas sp. Strain DSMZ 13134	*Fungi*	Approuvé	01/02/2014
Pythium oligandrum M1	***Fungi***	**Approuvé**	**01/05/2009**
Streptomyces K61 (formerly S. griseoviridis)	***Fungi***	**Approuvé**	**01/05/2009**
Streptomyces lydicus WYEC 108	*Fungi*, Bactérie	Approuvé	01/01/2015
Trichoderma asperellum (formerly T. harzianum) strains ICC012, T25 and TV1	*Fungi*	Approuvé	01/05/2009
Trichoderma asperellum ICC012 TV1	***Fungi***	**Approuvé**	**01/06/2013**
Trichoderma atroviride (formerly T. harzianum) strains IMI 206040 and T11	*Fungi*	Approuvé	01/05/2009
Trichoderma atroviride strain I-1237	*Fungi*	Approuvé	01/06/2013
Trichoderma atroviride strain SC1	*Fungi*	En attente	
Trichoderma gamsii (formerly T. viride) strain ICC080	*Fungi*	Approuvé	01/05/2009
Trichoderma harzianum strains T-22 and ITEM 908	*Fungi*	Approuvé	01/05/2009
Trichoderma polysporum strain IMI 206039	*Fungi*	Approuvé	01/05/2009

Les microorganismes utilisés dans le cadre de ce projet de recherche sont présentés en gras dans le tableau 5. Ce sont trois agents antagonistes qui représentent une grande variété de types de microorganismes, de cibles et d'usages recommandés.

- *Streptomyces griseoviridis* (nom commercial : MYCOSTOP®)

Le genre *Streptomyces* appartient à l'embranchement des Actinomycètes, et à la famille des *Streptomycetaceae* (Anderson and Wellington, 2001). Ce sont des bactéries à Gram positif, aérobies qui produisent un pseudomycélium, et sont ainsi appelées bactéries filamenteuses. Elles peuvent être extrémophiles, capables de survivre dans des conditions de température, de pH, teneur en sel ou pression extrêmes (Sivalingam *et al*., 2019).

Commercialisée sous la marque LALLEMAND PLANT CARE®, la souche *Streptomyces griseoviridis* K61 a été isolée à partir de tourbe de sphaigne finlandaise. Elle a été sélectionnée pour représenter les bactéries et particulièrement les actinomycètes. *In vitro* et sur milieu nutritif optimal (ISP2), ses colonies se développent lentement et produisent des filaments très fins qui s'apparentent à des hyphes mycéliens, ce qui fait partie des caractéristiques des actinomycètes. Son mycélium est principalement blanc puis présente des nuances brunes ou orangées, et s'organise de manière très dense. Ses conidies portées directement par le mycélium présentent une forme sphérique, de petites tailles (0,5-2 µm), elles sont souvent disposées en chaînette ou isolées et sont produites en grande quantité. C'est une bactérie omniprésente et naturelle que l'on trouve couramment dans le sol.

Son mode d'action est le suivant : elle peut coloniser les extrémités des racines en croissance des plantes et agir comme un parasite des champignons pathogènes des racines, ce qui contribue à protéger les plantes. D'autres mécanismes possibles comprennent la production et l'excrétion de métabolites antifongiques (par exemple, des antibiotiques et/ou des composés antifongiques de faible poids moléculaire ou des enzymes lytiques comme la chitinase) après la colonisation (Pertot *et al.*, 2015).

C'est une souche qui peut être utilisée comme agent antifongique dans les serres, les pépinières, les pelouses et les sites agricoles pour lutter contre ***Fusarium***, *Rhizoctonia, Pythium, Phytophthora, Phytomatotricum, Aphanomyces, Monosprascus, Armillaria, Sclerotinia, Postia, Verticillium, Geotrichum* et d'autres champignons responsables de la décomposition des racines. Elle peut être appliquée sous forme de mélange de terre ou de trempage sur les plantes en pot ou le gazon, ou sur le feuillage des plantes dans les serres.

Son principal avantage est lié au fait qu'après avoir colonisé l'extrémité des racines, il peut protéger la plante en permanence. D'un autre côté, l'efficacité n'est pas extrêmement élevée et sa capacité à coloniser la rhizosphère n'est pas validée pour de nombreuses cultures.

- *Trichoderma asperellum* (nom commercial : XEDAVIR®)

Le genre *Trichoderma* appartient à la division des ascomycètes et à la famille des *Hypocreaceae*

(Esposito and Silva, 1998). Ses espèces se présentent sous la forme caractéristique de colonies à la croissance rapide, de couleur initiale blanche ou hyaline et verdissant avec le temps. Ses colonies ont un aspect floculant ou touffu et compact (Meyer and Plaskowitz, 1989).

La souche *Trichoderma asperellum* ICC012 TV1 a été isolée à partir du système racinaire d'un plant de tomate cultivé en Italie en 1992 (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgique, MUCL 43093) et commercialisée sous la marque XEDA INTERNATIONAL®. Ce deuxième BCA représente ainsi le règne des champignons. *In vitro* et sur milieu nutritif optimal, les colonies se développent rapidement et produisent des filaments très ramifiés qui recouvrent la surface du milieu de culture. Son mycélium est d'abord blanc puis présente rapidement des nuances bleues à vertes principalement provoquée par la production de spores colorées mais peu de pigments sont diffusés dans le milieu de culture. Les conidies sont portées par des conidiophores ramifiés, généralement associés par paire à des phialides droits. Les conidies ont une forme globulaire à sous-globulaire et sont de petite taille (2-3 µm). Produites en très grandes quantité, elles sont donc pigmentées et disposées de manière relativement isolées (Samuels *et al*., 1999).

Trichoderma asperellum est un champignon à reproduction asexuée. Il peut déployer un ou plusieurs mécanismes d'action en fonction du pathogène cible. Il est capable d'utiliser une activité directe et hyperparasitaire contre les pathogènes qui prévaut, tandis que dans d'autres cas, c'est le mécanisme d'induction de la résistance qui prévaut ou la compétition avec les pathogènes pour l'espace et les nutriments. La souche peut produire une grande variété d'enzymes lytiques dont la plupart jouent un rôle important dans le biocontrôle (enzymes dégradant les parois cellulaires, CWDE) (Markovich and Kononova, 2003). Ces CWDE ont montré une activité antifongique contre un large spectre de pathogènes fongiques notamment les espèces de *Rhizoctonia, **Fusarium**, Alternaria, Ustilago, Venturia et Colletotrichum*, ainsi que des organismes ressemblant à des champignons tels que les oomycètes *Pythium* et *Phytophthora* (qui n'ont pas de chitine dans leurs parois cellulaires). *Trichoderma asperellum* peut produire également de nombreux métabolites secondaires, dont certains sont spécifiquement impliqués dans l'antibiose directe (Pellan *et al*., 2021; Win *et al*., 2021) comme des composés volatils (6-pentyl-α-pyrone (6PP)) et la plupart des dérivés de l'isocyanure . Sa production d'enzymes lytiques et de métabolites antibiotiques peut varier considérablement selon les conditions d'évolution et d'adaptation à l'environnement. C'est une souche qui semble être un très bon colonisateur du sol et la rhizosphère des plantes et les tissus racinaires (Pertot *et al.,* 2015).

En tant qu'habitant du sol et bon colonisateur de la matière organique, la souche est principalement utilisée contre les pathogènes transmis par le sol (*Fusarium*), les maladies du bois et la moisissure grise

(*Botrytis cinerea*). Dans les sols infestés, elle peut réduire de manière significative plusieurs pathogènes transmis par le sol et donc les maladies qui y sont liées comme la fusariose.

T. asperellum présente plusieurs avantages par rapport aux intrants chimiques synthétiques : il n'est pas toxique pour les mammifères et l'environnement, il ne laisse pas de résidus toxiques, il n'a pas d'effet négatif sur la microflore et la microfaune du sol et il n'affecte pas négativement la population naturelle de biocontrôle.

Pour être efficace, il doit être soigneusement choisi en fonction de ses mécanismes d'action et de son adaptation à l'environnement spécifique. La capacité intrinsèque de la souche à produire des enzymes lytiques et des métabolites antimicrobiens secondaires peut faire la différence. L'utilisation d'autres souches peu compétitives ou non adaptées aux caractéristiques du sol peut nuire à son efficacité (Woo *et al.*, 2023).
La plupart des échecs en termes d'efficacité peuvent être liés à l'utilisation d'un autre produit dont la viabilité des conidies est médiocre (cela se produit souvent lors de l'application d'engrais à base de *Trichoderma*), à une concentration insuffisante dans le sol, à un temps d'activité trop court (besoin d'un certain temps pour tuer l'agent pathogène), à une pression de maladie trop élevée. Quelques semaines après son application, la concentration de *Trichoderma* exogène a tendance à diminuer au court du temps (Pertot *et al*., 2015 ; Dethoup *et al.*, 2022).

Il existe plusieurs moyens d'améliorer son efficacité : l'augmentation de la quantité appliquée par unité de sol, qui est généralement limitée par le coût du produit commercial, l'utilisation de supports ou de substrats qui peuvent garantir une persistance plus longue (c'est-à-dire des substrats riches en cellulose ou en chitine), lui donner suffisamment de temps pour réduire l'inoculum avant la plantation, appliquer le produit lorsque le sol est en bon état ainsi que dans des conditions abiotiques optimales et qu'il n'y a pas de risque de contamination.

- *Pythium oligandrum* (nom commercial : POLYVERSUM®)

Représentant les oomycètes, la souche *Pythium oligandrum* ATCC 38472, isolée à partir de la betterave sucrière en République Tcheque et commercialisée sous la marque DE SANGOSSE, a été utilisée comme troisième BCA. *In vitro* et sur milieu nutritif optimal (V8), les colonies se développent très rapidement et recouvrent le milieu d'une fine couche de mycélium très ramifié. Le mycélium est blanc, se propage de manière très régulière et ne produit pas de pigments. Sa reproduction passe notamment par une phase asexuée et une phase sexuée impliquant la production de structures très caractéristiques appelées oogones, sphériques et dentelées (20 µm), et qui contiennent des oospores

(Pisarčik *et al.*, 2021).

Pythium oligandrum est un mycoparasite appartenant à la famille des *Pythiaceae*. Ce mycoparasite est largement répandu dans le monde. Il est commun dans le sol et dans ou sur les plantes. *Pythium oligandrum* agit comme un hyperparasite en colonisant d'autres champignons phytopathogènes dans et autour des semences et de la rhizosphère des plantes traitées, supprimant ainsi la croissance de plusieurs champignons pathogènes du sol, notamment *Alternaria, Botrytis,* ***Fusarium****, Gaeumannonyces, Ophiostoma, Phoma, Pseudocercosporella, Pythium, Sclerotinia et Sclerotium*.
P. oligandrum produit la protéine oligandrine et d'autres composés qui stimulent les parois cellulaires des plantes pour repousser l'invasion des pathogènes, et stimule également les mécanismes naturels de défense des plantes appelés protéines liées à la pathogénèse (PR) qui aident les plantes à résister aux maladies, sans nuire à la plante (Benhamou *et al.*, 2012).

Il peut être appliqué en tant que traitement des semences, trempage avant la plantation, pulvérisation aérienne, trempage du sol ou par l'intermédiaire d'un système d'irrigation (Bělonožníková *et al.*, 2022).

Le principal avantage est son large spectre d'activité et la possibilité d'être appliqué avec des systèmes d'irrigation. Toutefois, pour fonctionner efficacement, *P. oligandrum* a besoin d'un environnement humide et d'une température comprise entre 20 et 35°C pendant la période d'infection (*Ng et al.*, 2023). En cas de sécheresse, le début de l'infection peut être retardé jusqu'à ce qu'il y ait plus d'humidité. En outre, la quantité par hectare doit être suffisamment élevée, ce qui peut rendre le traitement très coûteux.

2.1.2. Comment améliorer l'efficacité des agents microbiens de biocontrôle ?

Outre les indications spécifiques données pour chaque agent de biocontrôle, il existe quelques moyens d'accroître leur l'efficacité. En premier lieu, il convient d'éviter leurs mauvaises utilisations ou applications. La plupart du temps, l'échec est dû au manque de connaissances sur la manière ou les conditions d'application, ce qui entraîne une mauvaise utilisation (Lahlali *et al.*, 2022).
Deuxièmement, il faut distinguer les échecs causés par l'application d'un bio-inoculum de mauvaise qualité. Souvent, l'inefficacité est due au fait que des engrais ou du compost contenant des agents de biocontrôle sont utilisés à la place de produits phytopharmaceutiques homologués. Cette mauvaise pratique a généré beaucoup de confusion autour des agents de biocontrôle (Collinge *et al.*, 2022).
Troisièmement, il faut connaitre leurs conditions optimales d'efficacité c'est-à-dire les conditions environnementales qui sont favorables à leur épanouissement face aux pathogènes. Les moyens spécifiques d'accroître l'efficacité des agents de contrôle biologique sont les suivants :

- Utilisation en combinaison avec des pratiques agronomiques dans le cadre d'une stratégie de lutte intégrée : dans ce cas, les agents de biocontrôle ne sont pas simplement appliqués en remplacement d'un intrant chimique, mais en combinaison avec des pratiques agronomiques, par exemple après solarisation, désinfestation anaérobie du sol ou bio-fumigation ;
- Vérifier l'efficacité de la souche contre la maladie spécifique et les bonnes conditions d'application (appliquer dans les conditions optimales) ;
- Vérifier la compatibilité entre la souche et la culture ou le cultivar, en particulier pour les colonisateurs de la rhizosphère ;
- Donner suffisamment de temps aux BCAs pour réduire l'inoculum de la maladie ;
- Calibrer la quantité par unité de sol à un niveau pouvant garantir l'efficacité (souvent, la quantité par hectare est limitée par le prix du produit) ;
- Développer des supports ou des substrats spécifiques pour augmenter leur efficacité ;
- Améliorer les systèmes de production pour réduire le coût des agents de biocontrôle ;
- Développer des stratégies pluriannuelles de lutte contre les pathogènes à l'aide d'agents de biocontrôle, en particulier ceux qui sont censés réduire l'inoculum des pathogènes dans le sol ;
- Identifier et sélectionner des souches plus efficaces (la plupart des souches commerciales ont été isolées il y a plus de 20 ans, la plupart du temps sans une sélection ciblée et une large comparaison entre les souches).

2.1.3. Les mécanismes d’action des BCAs

Comprendre les mécanismes d'action d'un agent de biocontrôle peut améliorer l’efficacité du contrôle, soit en améliorant ses mécanismes, soit en l’utilisant dans des conditions où l'on prévoit un meilleur succès (Boro *et al.*, 2022; Gerbore *et al.*, 2014; Howell, 2003). Ainsi, les divers mécanismes d’antagonisme employés par les agents de biocontrôle peuvent être directs ou indirects, les mécanismes directs résultent du contact physique (Junaid *et al.*, 2013). Il est donc primordial de comprendre les mécanismes qui sont à la base des interactions entre BCAs et phytopathogènes mycotoxinogènes dans le but d’optimiser leurs performances et de repérer des mécanismes particulièrement actifs et durables dans le temps. Cela pourrait servir de base pour les rechercher chez d’autres microorganismes d’intérêt.

2.1.3.1. Bio-compétition (spatiale ou nutritionnelle)

Pour faire face à certaines conditions environnementales, les BCAs et les pathogènes se disputent les nutriments (carbone, azote, fer…) et l'espace pour s'établir dans l'environnement(Junaid *et al.*, 2013;

Legrand *et al*., 2017). Certaines actinobactéries, telles que *Streptomyces* spp, influencent la fertilité du sol grâce à l'implication de nombreux composants qui servent d'exhausteurs de nutriments (qui rendent disponible certains nutriments). En plus de produire des sidérophores et d'être capable de solubiliser le phosphate, certains BCAs sont connus pour produire diverses enzymes dont l'amylase, la chitinase, la cellulase, l'invertase, la lipase, la kératinase, la peroxydase, la pectinase, la protéase, la phytase et la xylanase qui rendent simples les nutriments complexes, sous forme de minéraux ou d'autres formes plus accessibles à la plante (Vurukonda *et al.*, 2022). D'autre part, les BCAs peuvent modifier des facteurs abiotiques qui influencent le développement des *Fusarium* spp et la production de mycotoxines comme le pH ou la disponibilité en O_2, en nutriments et en eau (Gardiner *et al.*, 2009; Picot *et al.*, 2010). La bio-compétition se produit donc lorsque des niches écologiques particulières sont simultanément occupées par des agents pathogènes et des BCAs qui ont les mêmes exigences physiologiques (Samsudin *et al.*, 2017). Il est plus difficile d'évaluer ce type de mécanismes, c'est pourquoi seulement peu de BCAs ont directement été reliés à la bio-compétition (Celar, 2003; Liu *et al.*, 2013). Néanmoins, plusieurs études ont montré que ce phénomène pouvait être à l'origine de protection importante contre *F. graminearum* chez les céréales (Dawson *et al.*, 2004; Lakhesar *et al*., 2010).

2.1.3.2. Mycoparasitisme/ Mycophagie/ Activité enzymatique

Ces mécanismes impliquent une croissance des BCAs vers l'organisme cible sous forme d'attaque. Le mycoparasitisme est le parasitisme d'un microorganisme fongique par un autre microorganisme (Lecomte *et al.*, 2016). Le parasitisme implique généralement la synthèse de divers métabolites ou enzymes conduisant à la dégradation des structures fongiques suivie de l'absorption de nutriments/métabolites (Daguerre *et al.*, 2014). C'est donc la capacité de certains BCAs à hyperparasiter un microorganisme, soit en se connectant à ses ressources via la formation de structures particulières (appressorium, haustorium), soit en s'en nourrissant directement, il s'agira alors de mycophagie (Jeffries, 1995; Kim and Vujanovic, 2016). Pour amorcer ces mécanismes, les BCAs peuvent par exemple décomposer la paroi ou la membrane cellulaire des agents pathogènes via la production d'enzymes comme les chitinases, les chitosanases, les glucanases (Junaid *et al*., 2013). Les mycoparasites les plus étudiés sont les espèces du genre *Trichoderma,* qui sont les prédominants et les généralistes dans les environnements naturels, végétaux et pédologiques (Rousseau, 1996). Le mycoparasitisme a été identifié aussi chez de nombreux genres et espèces notamment *Pythium oligandrum* et chez des BCAs bactériens comme *Streptomyces* spp (You *et al.*, 2019; Tarkka *et al.*, 2009).

2.1.4.3. Antibiose (antibiotiques, composés volatils)

L'antibiose se rapporte à la production de différents composés de faibles poids moléculaires ayant une action sur la physiologie des pathogènes comme les antibiotiques, les enzymes lytiques, les composés volatils ou d'autres composés antifongiques, par des BCAs (Junaid *et al*., 2013; Legrand *et al.*, 2017). Les BCAs peuvent posséder un arsenal de métabolites ciblant différentes structures des pathogènes cibles qui freinent leur croissance, réduisent leur production de facteurs de virulence comme les mycotoxines ou les tuent (effets anti-germination, dégradation des parois, des membranes, anti-mycotoxinogenèse, même à faible dose) (Weller, 1988). Dans d'autres cas, les microorganismes, comme les *Pseudomonas* colonisateurs de racines, peuvent agir directement contre des pathogènes en produisant des composés organiques volatils (COV) qui ont des propriétés antifongiques (Samsudin and Magan, 2016). De nombreux microorganismes produisent et libèrent des enzymes lytiques qui peuvent hydrolyser une grande variété de composés polymères, notamment la chitine, les protéines, la cellulose, l'hémicellulose et l'ADN (Junaid *et al*., 2013).

2.1.4.4. PGPR, PGPF (Plant Growth Promoting Rhizobacteria/Fungi)

Les BCAs peuvent réduire l'effet des pathogènes dans les cultures en augmentant la croissance des plantes au moins pendant les premiers stades du cycle de vie (Legrand *et al.*, 2017). Les BCAs tant fongiques que bactériens, peuvent aider à gérer les maladies des plantes en favorisant leur croissance par une solubilisation et absorption accrue des nutriments et de l'eau, une augmentation du développement de leur système racinaires permettant ainsi une meilleure croissance de la plante (Junaid *et al.*, 2013).

2.1.4.5. Les mécanismes impactant la production de mycotoxines

Des études ont été menées en mesurant l'impact des BCAs sur les *Fusaria* et parfois les mycotoxines, mais les mécanismes spécifiques à la réduction des mycotoxines sont souvent ignorés. Certains BCAs ont développé un arsenal biologique permettant de combattre spécifiquement les mycotoxines considérées comme trait de virulence des pathogènes, et ces modes d'action pourraient représenter un atout majeur en termes de sûreté sanitaire des aliments. Parmi les mécanismes développés par les BCAs figurent l'inhibition des gènes de synthèse des toxines chez les pathogènes ou la biotransformation de ces molécules qui représentent des moyens de maitrise du risque mycotoxine dans les cultures. Certains des agents antagonistes ont déjà montré des capacités à interagir directement avec les gènes de biosynthèse des mycotoxines (Lee *et al*., 2014; Samsudin and Magan, 2016).

En plus de réduire la production des mycotoxines, les BCAs sont capables de biotransformer et/ou de

détoxifier les mycotoxines, une fois qu'elles ont été produites par les pathogènes (Pellan *et al.*, 2021). Ces mécanismes en aval de la synthèse des toxines peuvent être liés à des phénomènes de dégradation enzymatique, de modification et/ou de complexation des toxines ou d'adhésion et/ou de fixation, permettant une réduction de la toxicité de ces composés. Des études ont été menées sur la capacité de certains microorganismes à éliminer le DON. Ce processus nécessite l'intervention de différentes activités pour réduire la toxicité de cette molécule comme : la de-epoxydation réductive, l'acétylation, l'oxydation, l'épimérisation, la glycosylation ou la minéralisation (Karlovsky, 2011). Ces réactions peuvent conduire aux principaux composés de dégradation du DON : 3epi-DON, 3keto- DON, DOM1 (de-époxy-DON) et D3G (DON-3-O-glucoside) (Tian *et al.*, 2022, 2016).

2.1.5. Les enjeux des produits du contrôle biologique (avantages et limites)

Le biocontrôle reste une solution alternative et complémentaire aux produits de synthèse. Il présente certains avantages par rapport aux solutions conventionnelles. Les solutions de biocontrôle peuvent cibler une large gamme d'espèces. Selon la composition du produit de biocontrôle, les modes d'action peuvent être variés et ainsi limiter l'apparition de résistance chez les pathogènes ciblés. Dans le cas d'un agent de biocontrôle contre la fusariose du blé (*Pythium oligandrum*), il présente plusieurs modes d'action et peut les déployer en même temps. Il peut protéger les plantes directement via le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition et indirectement via l'induction de la résistance chez les plantes (Benhamou *et al.*, 2012).

Dans le cas des *Trichoderma*, son temps de maintien au champ va dépendre des conditions dans lesquelles l'implantation s'est faite (Ferreira *et al.*, 2020). Appartenant aux microorganismes issus de la rhizosphère, ils peuvent subsister dans ce type d'environnement pendant plusieurs mois (Larkin, 2016). Cela est un point crucial sur lequel il faut jouer pour l'efficacité du produit qui doit perdurer assez longtemps pour agir sur le pathogène.

Un autre intérêt des produits de biocontrôle est la possibilité de leur utilisation en agriculture biologique à condition que le BCA ne soit pas considéré comme un organisme génétiquement modifié.

A côté des avantages, ces produits présentent quelques limites. Très présents sur le marché dans le secteur du maraîchage, les produits de biocontrôle offrent encore peu de solutions en grandes cultures. Grâce à une croissance à deux chiffres, le marché, estimé à 2 milliards de dollars dans le monde (sur un marché des pesticides évalué à plus de 60 milliards de dollars), est effectivement en forte progression ces dernières années. Un autre point fait l'unanimité : le déficit de l'offre en grandes cultures est un réel handicap. Peu de produits homologués existent, et il semble que les solutions ne soient pas adaptées aux problématiques de terrain (Collinge *et al.*, 2022). La recherche de nouveaux

agents de biocontrôle s'effectue *in vitro* et ceci permet de tester différentes molécules ou microorganismes, de multiplier les cibles et d'évaluer la toxicité et la dégradation de composés avant de les tester *in planta* ou au champ. Cependant, une efficacité *in vitro* ne se traduit pas nécessairement par une même efficacité *in planta* ou au champ, du fait de la présence de conditions non maîtrisées comme des stress abiotiques variés. Cela s'observe également par le nombre très limité de produits de biocontrôle reconnus pour leur efficacité en plein champ par rapport au nombre de solutions testées *in vitro* (Usall *et al.*, 2016). Il faudrait plus de produits par cible et des produits pour d'autres usages, comme les herbicides par exemple. Les espoirs se tournent donc vers l'innovation et la recherche de microorganismes antagonistes caractérisés dans une recherche permanente d'optimisation des performances notamment l'efficacité et la durabilité.

La complexité dans les mécanismes des BCAs à différents stades de l'évolution des agents pathogènes et leur synergie rendent leur analyse difficile, soulignant l'importance de mettre au point des démarches expérimentales fiables pour mieux comprendre leur fonctionnement.

2.2. Les différentes approches utilisées en recherche sur les mécanismes de biocontrôle

Généralement, les approches fonctionnelles servent de base pour la sélection et la caractérisation des agents de biocontrôle. En quête de réponses sur des problématiques fondamentales ou appliquées liées à l'impact du changement climatique sur le biocontrôle, des essais ont été développés pour cribler et caractériser des BCAs, les capacités d'inhibition de différents traits pathogènes, ou la production de composés antifongiques sous différents facteurs abiotiques. De ces études ressortent souvent différents critères permettant d'établir des facteurs de discrimination des BCAs : leur capacité à réduire la croissance d'un ou de plusieurs pathogènes, ensuite leur capacité à produire des enzymes lytiques, des composés antifongiques et la mesure de l'impact pathogène sur la plante. Ces recherches impliquent aussi différents niveaux d'étude partant de l'*in vitro* jusqu'à l'*in planta* en passant par l'*in situ (in spicula)*. Le potentiel antagoniste d'un microorganisme candidat est souvent testé lors d'un premier criblage en conditions *in vitro*, suivi par des tests d'efficacité dans des essais biologiques sur matrices végétales ou en conditions naturelles au champ.

Pour caractériser les mécanismes de BCAs vis-à-vis d'un agent pathogène, plusieurs champs disciplinaires, avec différents outils de recherche, entrent en jeu : la microbiologie, la microscopie, la biochimie, la biologie moléculaire, la bio-informatique et les mathématiques. Le coût et le temps impliqués dans chacune de ces méthodes en fonction des objectifs est une question centrale lors du choix des stratégies de recherche à mettre en place pour mener à bien son projet. De plus, même si ces recherches sont motivées par l'apport important en termes d'applications agronomiques, sanitaires et

économiques, elles permettent également l'exploration des possibles effets du changement climatique sur les mécanismes d'interaction plante-BCA- pathogène dans l'objectif d'optimisation de l'usage des produits de biocontrôle notamment les BCAs.

2.2.1. Les tests *in vitro* (confrontations directes sous différentes conditions abiotiques)

En matière de recherche, plusieurs méthodes existent pour susciter l'expression de gènes silencieux, pour découvrir de nouvelles activités et de nouveaux métabolites d'intérêt. Ces méthodes sont plus ou moins complexes et coûteuses à mettre en œuvre. Les confrontations directes *in vitro* font partie de ces méthodes et se font sur boîte de Petri avec un milieu nutritif ou avec un support végétal (épillets). Elles permettent de détecter des activités antagonistes chez les BCAs en coculture avec des pathogènes. Différents paramètres de culture peuvent être modifiés afin de voir une adaptation de la réponse biologique ou métabolique d'un microorganisme donné (Abdallah *et al*., 2018; Segaran and Sathiavelu, 2019).

La confrontation entre microorganismes antagonistes est particulièrement intéressante car elle peut simuler des interactions susceptibles d'exister dans la nature (Vallet *et al*., 2017). Cela permet de mettre en place des interactions qui n'existeraient pas en monoculture, et donc de susciter la production de molécules qui ne seraient pas produites autrement, ou en plus grande concentration qu'elles ne le seraient en monoculture (Liu and Kakeya, 2020). Les confrontations sont majoritairement réalisées sur des milieux de culture très riches et génériques (Berg *et al*., 2017; Comby *et al*., 2017) pour permettre le développement des microorganismes.

Après incubation sous différentes conditions abiotiques (température, humidité…), différentes observations macroscopiques et microscopiques peuvent être réalisées. Avec des outils d'analyses d'images qui ont été développés, l'impact des BCAs sur le pathogène et aussi l'impact des facteurs abiotiques sur les deux microorganismes et leur interaction peuvent être mesurés à partir des photos de boîte de Petri de confrontation. Selon les modes de contacts des microorganismes, il est possible de déterminer le mécanisme d'action utilisé par le BCA : la présence d'inhibition de croissance du pathogène avant contact avec le BCA traduit la sensibilité du pathogène aux composés antifongiques produits par le BCA (Zhao *et al*., 2014). Pour un criblage complet de BCAs, il est important de passer par une étape *in situ* (sur épillets de blé par exemple) pour confirmer leur efficacité.

2.2.2. Les tests *in spicula* (confrontations sur épillets sous différentes conditions abiotiques)

Plusieurs études, sur l'identification des effets antagonistes de BCAs vis-à-vis de pathogènes, ont été réalisées sur du matériel végétal (Comby *et al*., 2017 ; Zhang *et al*., 2014). Ces essais ont permis de

tester le potentiel antagoniste de BCAs dans des conditions plus proches des conditions environnementales naturelles de la plante. Ils ont permis aussi de cribler des BCAs contre des agents pathogènes difficiles à cultiver *in vitro,* comme les biotrophes obligatoires. La connaissance préalable des parties de la plante sur lesquelles les infections ont lieu et où les symptômes sont observés, permet de les utiliser et d'y effectuer directement les confrontations. Les inoculations peuvent se faire, d'une part, à partir d'inoculum produit en milieu synthétique, déposé ou pulvérisé sur l'organe. D'autre part, le matériel végétal peut être directement plongé dans l'inoculum. Ainsi, pour évaluer l'impact des BCAs sur le pathogène et leur capacité à protéger la plante, des notations visuelles des symptômes peuvent être effectuées à l'aide des échelles de notations connues. Plusieurs études ont mis en évidence l'intérêt du test sur des épillets de blé détachés. Les résultats ont révélé des informations concernant la capacité de croissance et l'efficacité des souches de BCAs sur la plante ciblée contre le pathogène, avant de les tester sur des plantes entières (Comby *et al*., 2017). Mais aussi, ces tests peuvent permettre de révéler le caractère endophyte des BCAs ou encore de s'assurer de l'absence de pathogénicité sur les plantes cibles (Ait Bahadou *et al*., 2018). Après l'étape *in spicula*, vient le passage sur la plante entière qui est l'hôte à protéger.

2.2.3. Les tests *in planta* (confrontations directes sur plante)

La plante reste l'étape ultime qui permet de certifier l'efficacité d'un BCA vis-à-vis d'un pathogène que ce soit sous serre ou aux champs. Après une validation *in vitro* et *in spicula*, la dernière étape d'évaluation a lieu lors d'essais sur plantes. Ces essais présentent l'avantage d'être le plus proche des conditions environnementales naturelles des pathosystèmes. En effet, l'efficacité de certaines souches de BCAs peut être altérée par différentes espèces de plantes hôtes. Cela peut s'expliquer par le fait que certains BCAs endophytes préfèrent coloniser des génotypes de plantes particuliers pour interagir plus efficacement avec les agents pathogènes. Sur le terrain, les facteurs abiotiques sont fluctuants et peuvent agir défavorablement sur la qualité et la reproductibilité des résultats. Cela, aussi, peut rendre compliquer les analyses de comparaison des candidats BCA ainsi que leurs modes d'action (Martín *et al*., 2015; Pliego *et al*., 2011). D'où l'intérêt de tester d'abord l'impact de plusieurs conditions abiotiques sur les BCAs et le pathogène cible dès l'étape *in vitro* afin de se rapprocher des conditions naturelles au champ.

Références

Abbas, A., Yli-Mattila, T., 2022. Biocontrol of *Fusarium graminearum*, a Causal Agent of Fusarium Head Blight of Wheat, and Deoxynivalenol Accumulation: From *In Vitro* to *In Planta*. Toxins 14, 299. https://doi.org/10.3390/toxins14050299

Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., 2006. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. International Immunopharmacology 6, 1251–1258. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.03.012

Abdallah, M.F., Ameye, M., Saeger, S.D., Audenaert, K., Haesaert, G., Abdallah, M.F., Ameye, M., Saeger, S.D., Audenaert, K., Haesaert, G., 2018. Biological Control of Mycotoxigenic Fungi and Their Toxins: An Update for the Pre-Harvest Approach, in: Mycotoxins - Impact and Management Strategies. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.76342

Adams, M.R., Moss, M.O., 2007. Food Microbiology. New Age International.

Adeleke, B.S., Ayilara, M.S., Akinola, S.A., Babalola, O.O., 2022. Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. Egyptian Journal of Biological Pest Control 32, 46. https://doi.org/10.1186/s41938-022-00547-1

Ait Bahadou, S., Ouijja, A., Karfach, A., Tahiri, A., Lahlali, R., 2018. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. Microb Pathog 117, 7–15. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.011

Ait Kettout, T., Rahmania, F., 2010. Identification par CG-SM de l'acide phénylacétique produit par *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, agent causal du bayoud. Comptes Rendus Biologies 333, 808–813. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.10.001

Altieri, V., Rossi, V., Fedele, G., 2023. Efficacy of preharvest application of biocontrol agents against gray mold in grapevine. Frontiers in Plant Science 14.

Anderson, A.S., Wellington, E.M., 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 797–814. https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797

Aoki, T., 2022. Comparative taxonomic studies on *Fusarium*, especially those species harmful to plants. J Gen Plant Pathol 88, 408–412. https://doi.org/10.1007/s10327-022-01085-2

Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D.M., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J Gen Plant Pathol 80, 189–201. https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3

Arrúa, A.A., Mendes, J.M., Arrúa, P., Ferreira, F.P., Caballero, G., Cazal, C., Kohli, M.M., Peralta, I., Ulke, G., Fernández Ríos, D., 2019. Occurrence of Deoxynivalenol and Ochratoxin A in Beers and Wines Commercialized in Paraguay. Toxins 11, 308. https://doi.org/10.3390/toxins11060308

Asad, S.A., 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. Ecological Complexity 49, 100978. https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978

Bach, E., Seger, G.D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B.B., Passaglia, L.M.P., 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. Applied Soil Ecology 99, 141–149. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002

Backhouse, D., 2014. Global distribution of *Fusarium graminearum, F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. Eur J Plant Pathol 139, 161–173. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0374-5

Baert, K., Devlieghere, F., Amiri, A., De Meulenaer, B., 2012. Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. International Journal of Food Microbiology 154, 119–129. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.015

Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, Special Issue Predictive Modelling 23, 277–294. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0

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. Sci Rep 6, 24328. https://doi.org/10.1038/srep24328

Bawden, R.J., 1991. Systems Thinking and Practice in Agriculture1. Journal of Dairy Science 74, 2362–2373. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78410-5

Beaudoin, N., Saad, J.K., Van Laethem, C., Machet, J.M., Maucorps, J., Mary, B., 2005. Nitrate leaching in intensive agriculture in Northern France: Effect of farming practices, soils and crop rotations. Agriculture, Ecosystems & Environment 111, 292–310. https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.06.006

Bellí, N., Marín, S., Duaigües, A., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 591–594. https://doi.org/10.1002/jsfa.1702

Bělonožníková, K., Hýsková, V., Vašková, M., Křížek, T., Čokrtová, K., Vaněk, T., Halířová, L., Chudý, M., Žufić, A., Ryšlavá, H., 2022. Seed Protection of *Solanum lycopersicum* with *Pythium oligandrum* against *Alternaria brassicicola* and *Verticillium albo-atrum*. Microorganisms 10, 1348. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071348

Benhamou, N., le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., 2012. P*ythium oligandrum*: an example of opportunistic success. Microbiology 158, 2679–2694. https://doi.org/10.1099/mic.0.061457-0

Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 16, 497–516. https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003

Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., Smalla, K., 2017. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. FEMS Microbiology Ecology 93, fix050. https://doi.org/10.1093/femsec/fix050

Bian, Y., Zhang, Y., Zhou, Y., Wei, B., Feng, X., 2023. Recent Insights into Sample Pretreatment Methods for Mycotoxins in Different Food Matrices: A Critical Review on Novel Materials. Toxins 15, 215. https://doi.org/10.3390/toxins15030215

Boedi, S., Berger, H., Sieber, C., Münsterkötter, M., Maloku, I., Warth, B., Sulyok, M., Lemmens, M., Schuhmacher, R., Güldener, U., Strauss, J., 2016. Comparison of *Fusarium graminearum* Transcriptomes on Living or Dead Wheat Differentiates Substrate-Responsive and Defense-Responsive Genes. Frontiers in Microbiology 7.

Boro, M., Sannyasi, S., Chettri, D., Verma, A.K., 2022. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. Arch Microbiol 204, 666. https://doi.org/10.1007/s00203-022-03279-w

Botana, L.M., Sainz, M.J., 2015. Climate Change and Mycotoxins. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

Boutigny, A.-L., Gautier, A., Basler, R., Dauthieux, F., Leite, S., Valade, R., Aguayo, J., Ioos, R., Laval, V., 2017. Un outil moléculaire basé sur le séquençage haut débit pour caractériser les Fusarium sur céréales. Innovations Agronomiques 59, 55–61. https://doi.org/10.15454/1.513785287764323E12

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 Biol 114, 555–571. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.006

Broydé, H., Doré, T., 2013. Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium et Aspergillus spp*. Cahiers Agricultures 22, 182-194 (1). https://doi.org/10.1684/agr.2012.0571

Calvo, H., Roudet, J., Gracia, A.P., Venturini, M.E., Fermaud, M., 2021. Comparison of efficacy and modes of action of two high-potential biocontrol *Bacillus* strains and commercial biocontrol products against *Botrytis cinerea* in table grapes. OENO One 55, 229–243. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4688

Cavinder, B., Sikhakolli, U., Fellows, K.M., Trail, F., 2012. Sexual Development and Ascospore Discharge in *Fusarium graminearum.* JoVE (Journal of Visualized Experiments) e3895. https://doi.org/10.3791/3895

Celar, F., 2003. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. Biological Control 28, 19–24. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00049-5

Chabasse, D., 2002. Biologie médicale N°25. C AHIER Formation LES MOISISSURES D'INTÉRÊT MÉDICAL. Mars PDF Téléchargement Gratuit. URL https://docplayer.fr/7573503-Biologie-medicale-n-25-c-ahier-formation-les-moisissures-d-interet-medical-mars-2002.html.

Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F., 2004. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. Plant Science 166, 1389–1415. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.004

Chellemi, D.O., van Bruggen, A.H.C., Finckh, M.R., 2017. CHAPTER 4.8: Direct Control of Soilborne Diseases, in: Plant Diseases and Their Management in Organic Agriculture, IPM. The American Phytopathological Society, pp. 217–226. https://doi.org/10.1094/9780890544785.017

Chen, Y., Kistler, H.C., Ma, Z., 2019. *Fusarium graminearum* Trichothecene Mycotoxins: Biosynthesis, Regulation, and Management. Annual Review of Phytopathology 57, 15–39. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100318

Collinge, D.B., Jensen, D.F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M.W., Shaw, R.H., 2022. Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? Plant Pathology 71, 1024–1047. https://doi.org/10.1111/ppa.13555

Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., Baillieul, F., 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against Fusarium head blight using two different in vitro tests. Microbiological Research 202, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014

Čonková, E., Laciaková, A., Pástorová, B., Seidel, H., Kováč, G., 2001. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. Toxicology Letters 121, 145–149. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00312-5

Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., 2014a. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. Fungal Biology Reviews 28, 97–125. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001

Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., 2014b. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. Fungal Biology Reviews 28, 97–125. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001

Daryaei, A., Jones, E. e., Ghazalibiglar, H., Glare, T. r., Falloon, R. e., 2016a. Culturing conditions affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani* in ryegrass. Journal of Applied Microbiology 121, 461–472. https://doi.org/10.1111/jam.13163

Daryaei, A., Jones, E. e., Ghazalibiglar, H., Glare, T. r., Falloon, R. e., 2016b. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination, and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. Journal of Applied Microbiology 120, 999–1009. https://doi.org/10.1111/jam.13076

Davey, K.R., 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. Journal of Applied Bacteriology 67, 483–488. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02519.x

Davis, N.D., Wagener, E., Dalby, D.K., Morgan-Jones, G., Diener, U.L., 1975. Toxigenic fungi in food. Appl Microbiol 30, 159–161. https://doi.org/10.1128/am.30.1.159-161.1975

Dawson, W.A.J.M., Jestoi, M., Rizzo, A., Nicholson, P., Bateman, G.L., 2004. Field Evaluation of Fungal Competitors of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*, Causal Agents of Ear Blight of Winter Wheat, for the Control of Mycotoxin Production in Grain. Biocontrol Science and Technology 14, 783–799. https://doi.org/10.1080/09583150410001720680

De Boevre, M., Di Mavungu, J.D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G., De Saeger, S., 2012. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. World Mycotoxin Journal 5, 207–219. https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1410

De Wolf, E.D., Madden, L.V., Lipps, P.E., 2003. Risk Assessment Models for Wheat Fusarium Head Blight Epidemics Based on Within-Season Weather Data. Phytopathology® 93, 428–435. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.428

Deacon, J.W., 2005. Fungal Biology. John Wiley & Sons.

Dean, R., Van Kan, J. a. L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13, 414–430. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Desai, S., Dubey, S.C., Prasad, R.D., 2020. Impacts of climate change on *Fusarium* species vis-à-vis adaptation strategies. Indian Phytopathology 73, 593–603. https://doi.org/10.1007/s42360-020-00258-3

Desjardins, A.E., 2006. Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology.

Dethoup, T., Klaram, R., Pankaew, T., Jantasorn, A., 2022. Impact of fungicides and plant extracts on biocontrol agents and side-effects of *Trichoderma spp.* on rice growth. Eur J Plant Pathol 164, 567–582. https://doi.org/10.1007/s10658-022-02581-z

Dey, D.K., Kang, J.I., Bajpai, V.K., Kim, K., Lee, H., Sonwal, S., Simal-Gandara, J., Xiao, J., Ali, S., Huh, Y.S., Han, Y.-K., Shukla, S., 2022. Mycotoxins in food and feed: toxicity, preventive challenges, and advanced detection techniques for associated diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 0, 1–22. https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2059650

Dickson, A.D., Link, K.P., Roche, B.H., Dickson, J.G., 1930. Report on the emetic substances in *Gibberella*-infected Barley. Phytopathology 20.

Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M., 2003. Influence of Climatic Factors on *Fusarium* Species Pathogenic to Cereals. European Journal of Plant Pathology 109, 755–768. https://doi.org/10.1023/A:1026090626994

Drakopoulos, D., Sulyok, M., Jenny, E., Kägi, A., Bänziger, I., Logrieco, A.F., Krska, R., Vogelgsang, S., 2021. Fusarium Head Blight and Associated Mycotoxins in Grains and Straw of Barley: Influence of Agricultural Practices. Agronomy 11, 801. https://doi.org/10.3390/agronomy11040801

E, N.P., 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification.

El-Katatny, M.H., Abdelzaher, H.M.A., Shoulkamy, M.A., 2006. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). Archives of Phytopathology and Plant Protection 39, 289–301. https://doi.org/10.1080/03235400500222396

El-Sayed, R.A., Jebur, A.B., Kang, W., El-Demerdash, F.M., 2022. An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. Journal of Future Foods 2, 91–102. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.002

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R., 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited "FAO estimate" of 25. Crit Rev Food Sci Nutr 60, 2773–2789. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570

Esposito, E., Silva, M. da, 1998. Systematics and Environmental Application of the Genus *Trichoderma*. Critical Reviews in Microbiology 24, 89–98. https://doi.org/10.1080/10408419891294190

Fapohunda, S.O., Adewunmi, A.A., 2019. Climate change and mycotoxins - The African experience. Croatian journal of food science and technology 11, 283–290. https://doi.org/10.17508/CJFST.2019.11.2.09

Fedele, G., González-Domínguez, E., Rossi, V., 2020. Influence of Environment on the Biocontrol of Botrytis cinerea: A Systematic Literature Review, in: De Cal, A., Melgarejo, P., Magan, N. (Eds.), How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases, Progress in Biological Control. Springer International Publishing, Cham, pp. 61–82. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53238-3_5

Fernandez-Acero, F.J., Carbu, M., Garrido, C., Vallejo, I., Cantoral, J.M., 2007. Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. Current Proteomics 4, 79–88.

Ferreira, F.V., Herrmann-Andrade, A.M., Calabrese, C.D., Bello, F., Vázquez, D., Musumeci, M.A., 2020. Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (Citrus sinensis L. (Osbeck)). Journal of Applied Microbiology 129, 712–727. https://doi.org/10.1111/jam.14657

Fravel, D.R., 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43, 337–359. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924

García-Núñez, H.G., Martínez-Campos, Á.R., Hermosa-Prieto, M.R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C.J., González-Esquivel, C.E., García-Núñez, H.G., Martínez-Campos, Á.R., Hermosa-Prieto, M.R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C.J., González-Esquivel, C.E., 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista mexicana de fitopatología 35, 58–79. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4

Gardiner, D.M., Kazan, K., Manners, J.M., 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Fungal Genet Biol 46, 604–613. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.004

Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., Rey, P., 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. Environ Sci Pollut Res 21, 4847–4860. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1807-6

Gerez, J.R., Pinton, P., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P., Bracarense, A.P.F.L., 2015. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induces systemic histological changes in pigs. Experimental and Toxicologic Pathology 67, 89–98. https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.10.001

Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. Int J Food Microbiol 23, 419–431. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90167-8

Gizachew, D., Chang, C.-H., Szonyi, B., De La Torre, S., Ting, W.E., 2019. Aflatoxin B1 (AFB1) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. International Journal of Food Microbiology 296, 8–13. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.017

Goh, Y.K., Daida, P., Vujanovic, V., 2009. Effects of abiotic factors and biocontrol agents on chlamydospore formation in *Fusarium graminearum* and *Fusarium sporotrichioide*s. Biocontrol Science and Technology 19, 151–167. https://doi.org/10.1080/09583150802627033

Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol Plant Pathol 5, 515–525. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x

Grigoriev, I.V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otillar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., Shabalov, I., 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. Nucl. Acids Res. 42, D699–D704. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183

Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., 2019a. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins 11, 375. https://doi.org/10.3390/toxins11070375

Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., 2019b. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins 11, 375. https://doi.org/10.3390/toxins11070375

Haddoudi, I., Cabrefiga, J., Mora, I., Mhadhbi, H., Montesinos, E., Mrabet, M., 2021. Biological control of Fusarium wilt caused by *Fusarium equiseti* in *Vicia faba* with broad spectrum antifungal plant-associated Bacillus spp. Biological Control 160, 104671. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104671

Hallen-Adams, H.E., Wenner, N., Kuldau, G.A., Trail, F., 2011. Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum.* Phytopathology 101, 1091–1096. https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0023

Halouat, A.E., Debevere, J.M., 1997. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. International Journal of Food Microbiology 35, 41–48. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01219-6

Howell, C.R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Disease 87, 4–10. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4

Jank, B., Rath, J., Marko, D., Vejdovszky, K., Rauscher-Gabernig, E., 2020. Exploring the TTC approach as a basis for risk management: The example of emerging *Alternaria* mycotoxins. Toxicology Letters 320, 124–128. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.11.027

Jeffries, P., 1995. Biology and Ecology of Mycoparasitism, in: Canadian Journal of Botany. Presented at the 5th International Mycological Congress, Natl Research Council Canada, Vancouver, Canada, pp. S1284–S1290. https://doi.org/10.1139/b95-389

Junaid, J., Dar, N.A., Bhat, T., Bhat, A., Bhat, M., 2013. Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. Int J Modern Plant&Anim Sci. 1, 39–57.

Karlovsky, P., 2011. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. Appl Microbiol Biotechnol 91, 491–504. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3401-5

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. Mol Plant Pathol 13, 399–413. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x

Kim, S.H., Vujanovic, V., 2016. Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium spp*. and mycotoxins production. Appl Microbiol Biotechnol 100, 5257–5272. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7539-z

Kostić, A.Ž., Milinčić, D.D., Petrović, T.S., Krnjaja, V.S., Stanojević, S.P., Barać, M.B., Tešić, Ž.L., Pešić, M.B., 2019. Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review. Toxins 11, 64. https://doi.org/10.3390/toxins11020064

Kotowicz, N., Frąc, M., Lipiec, J., 2014. The Importance of *Fusarium* Fungi in Wheat Cultivation – Pathogenicity and Mycotoxins Production: A Review.

Kpan Kpan, K.G., Hyacinthe Youan, B.B.D., Paul Gnonsoro, U., Ardjouma, D., 2022. Présence des aflatoxines et de l'ochratoxine A dans les denrées alimentaires : évaluation du risque encouru par des consommateurs de poisson fermenté (adjuevan) commercialisé à Abidjan (Côte d'Ivoire). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. https://doi.org/10.25518/1780-4507.19674

Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., Barka, E.A., 2022. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. Microorganisms 10, 596. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596

Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. International Journal of Food Microbiology 103, 315–322. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002

Lakhesar, D.P.S., Backhouse, D., Kristiansen, P., 2010. Nutritional constraints on displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal straw by antagonists. Biological Control 55, 241–247.

Larkin, R.P., 2016. Impacts of biocontrol products on Rhizoctonia disease of potato and soil microbial communities, and their persistence in soil. Crop Protection 90, 96–105. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.012

Latham, R.L., Boyle, J.T., Barbano, A., Loveman, W.G., Brown, N.A., 2023. Diverse mycotoxin threats to safe food and feed cereals. Essays in Biochemistry EBC20220221. https://doi.org/10.1042/EBC20220221

Laut, S., Poapolathep, S., Piasai, O., Sommai, S., Boonyuen, N., Giorgi, M., Zhang, Z., Fink-Gremmels, J., Poapolathep, A., 2023. Storage Fungi and Mycotoxins Associated with Rice Samples Commercialized in Thailand. Foods 12, 487. https://doi.org/10.3390/foods12030487

Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., Steinberg, C., 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. Biological Control 101, 17–30.

Lee, T., Lee, S.-H., Shin, J.Y., Kim, H.-K., Yun, S.-H., Kim, H.-Y., Lee, S., Ryu, J.-G., 2014. Comparison of Trichothecene Biosynthetic Gene Expression between *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum.* Plant Pathol J 30, 33–42. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2013.0107

Legrand, F., Picot, A., Cobo-Díaz, J.F., Chen, W., Le Floch, G., 2017. Challenges facing biological control strategies for the management of Fusarium Head Blight of cereals caused by *F. graminearum*. Biological Control 113, 26–38. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.06.011

Leonard, K.J., Bushnell, W.R., 2003. Fusarium head blight of wheat and barley. Fusarium head blight of wheat and barley.

Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., Steinberg, C., 2013. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. Agron. Sustain. Dev. 33, 97–111. https://doi.org/10.1007/s13593-012-0098-5

Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2008. The *Fusarium* Laboratory Manual. John Wiley & Sons.

Liu, C., Kakeya, H., 2020. Cryptic Chemical Communication: Secondary Metabolic Responses Revealed by Microbial Co-culture. Chemistry – An Asian Journal 15, 327–337. https://doi.org/10.1002/asia.201901505

Liu, P., Luo, L., Long, C., 2013. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. Biological Control 67, 157–162. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.011

Madriz-Ordeñana, K., Pazarlar, S., Jørgensen, H.J.L., Nielsen, T.K., Zhang, Y., Nielsen, K.L., Hansen, L.H., Thordal-Christensen, H., 2022. The *Bacillus cereus* Strain EC9 Primes the Plant Immune System for Superior Biocontrol of *Fusarium oxysporum*. Plants 11, 687. https://doi.org/10.3390/plants11050687

Magan, N., 2020. Importance of Ecological Windows for Efficacy of Biocontrol Agents, in: De Cal, A., Melgarejo, P., Magan, N. (Eds.), How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases, Progress in Biological Control. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53238-3_1

Magan, N., Aldred, D., Mylona, K., Lambert, R.J.W., 2010. Limiting mycotoxins in stored wheat. Food Additives & Contaminants: Part A 27, 644–650. https://doi.org/10.1080/19440040903514523

Magan, N., Medina, A., Aldred, D., 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. Plant Pathology 60, 150–163. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02412.x

Magan, N., Olsen, M., 2004. Mycotoxins in Food: Detection and Control. Woodhead Publishing.

Malir, F., Pickova, D., Toman, J., Grosse, Y., Ostry, V., 2023. Hazard characterisation for significant mycotoxins in food. Mycotoxin Res 39, 81–93. https://doi.org/10.1007/s12550-023-00478-2

Manstretta, V., Rossi, V., 2016. Effects of temperature and moisture on development of *Fusarium graminearum* perithecia in maize stalk residues. Applied and environmental microbiology 82, 184–191.

Marín, S., Cuevas, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2008. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. International Journal of Food Microbiology 121, 139–149. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.030

Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food and Chemical Toxicology 60, 218–237. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047

Markovich, N.A., Kononova, G.L., 2003. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology 39, 341–351. https://doi.org/10.1023/A:1024502431592

Marks, R.E., 2007. Validating Simulation Models: A General Framework and Four Applied Examples. Comput Econ 30, 265–290. https://doi.org/10.1007/s10614-007-9101-7

Martín, J.A., Macaya-Sanz, D., Witzell, J., Blumenstein, K., Gil, L., 2015. Strong in vitro antagonism by elm xylem endophytes is not accompanied by temporally stable in planta protection against a vascular pathogen under field conditions. Eur J Plant Pathol 142, 185–196. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0602-2

Medina, Á., González-Jartín, J.M., Sainz, M.J., 2017. Impact of global warming on mycotoxins. Current Opinion in Food Science, Food Toxicology • Food Safety 18, 76–81. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.009

Meyer, R.J., Plaskowitz, J.S., 1989. Scanning Electron Microscopy of Conidia and Conidial Matrix of *Trichoderma*. Mycologia 81, 312–317. https://doi.org/10.1080/00275514.1989.12025665

Moosavi, M.R., 2020. Efficacy of Microbial Biocontrol Agents in Integration with Other Managing Methods against Phytoparasitic Nematodes, in: Ansari, R.A., Rizvi, R., Mahmood, I. (Eds.), Management of Phytonematodes: Recent Advances and Future Challenges. Springer, Singapore, pp. 229–258. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4087-5_10

Moretti, A., Pascale, M., Logrieco, A.F., 2019. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. Trends in Food Science & Technology, Keeping Food Safety on the Agenda for 15 years – The SAFE consortium 84, 38–40. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.008

Moschini, R.C., Fortugno, C., 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. Eur J Plant Pathol 102, 211–218. https://doi.org/10.1007/BF01877959

Munkvold, G.P., 2003. Cultural and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize. Annual Review of Phytopathology 41, 99–116. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095510

Musa, T., Hecker, A., Vogelgsang, S., Forrer, H.R., 2007. Forecasting of Fusarium head blight and deoxynivalenol content in winter wheat with FusaProg*. EPPO Bulletin 37, 283–289. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2007.01122.x

Nazari, L., Pattori, 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

Nazari, L., Pattori, 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

Neme, K., Mohammed, A., 2017. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategy. A review. Food Control 78, 412–425. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012

Ng, C.A., Pernica, M., Litvanova, K., Kolouchova, I., Branyik, T., 2023. Biocontrol Using *Pythium oligandrum* during Malting of Fusarium-Contaminated Barley. Fermentation 9, 257. https://doi.org/10.3390/fermentation9030257

Ng'ang'a, Z.W., Niyonshuti, E., Ng'ang'a, Z.W., Niyonshuti, E., 2022. Animal Feeds Mycotoxins and Risk Management, in: Mycotoxins and Food Safety - Recent Advances. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.102010

Nganou Donkeng, N., Sokamte Tegang, A., Tchinda Sonwa, E., Ntsamo Beumo, T.M., Nodem Sohanang, F.S., Douanla Nodem, N.F., Noumo Ngamou, T., Tatsadjieu Ngoune, L., 2022. Fungal diversity and occurrence of Aflatoxin B1, Citrinine, and Ochratoxin A in rice of Cameroon. Journal of Food Processing and Preservation 46, e16429. https://doi.org/10.1111/jfpp.16429

Nguyen, P.-A., Strub, C., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., 2017. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. Biological Control 104, 10–27. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.004

Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J.-L., Mounier, J., Vasseur, V., 2021. Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. Food Research International 148, 110610. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610

Nikitin, D.A., Ivanova, E.A., Semenov, M.V., Zhelezova, A.D., Ksenofontova, N.A., Tkhakakhova, A.K., Kholodov, V.A., 2023. Diversity, Ecological Characteristics, and Identification of Some Problematic Phytopathogenic *Fusarium* in Soil: A Review. Diversity 15, 49. https://doi.org/10.3390/d15010049

Norlia, M., Jinap, S., Nor-Khaizura, M.Ab.R., Radu, S., John, J.M., Rahman, M.A.H., Peter, M.L., Sharif, Z., 2020. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate of Aspergillus flavus and aflatoxin production in peanut meal extract agar. International Journal of Food Microbiology 335, 108836. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108836

O'Brien, P.A., 2017. Biological control of plant diseases. Australasian Plant Pathol. 46, 293–304. https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4

O'Donnell, K., Rooney, A.P., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Ward, T.J., Frandsen, R.J.N., Lysøe, E., Rehner, S.A., Aoki, T., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Kang, S., Geiser, D.M., 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. Fungal Genetics and Biology 52, 20–31. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004

Olesen, J.E., Børgesen, C.D., Elsgaard, L., Palosuo, T., Rötter, R.P., Skjelvåg, A.O., Peltonen-Sainio, P., Börjesson, T., Trnka, M., Ewert, F., Siebert, S., Brisson, N., Eitzinger, J., van Asselt, E.D., Oberforster, M., van der Fels-Klerx, H.J., 2012. Changes in time of sowing, flowering, and

maturity of cereals in Europe under climate change. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 29, 1527–1542. https://doi.org/10.1080/19440049.2012.712060

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., Grosse, Y., 2017. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. Mycotoxin Res 33, 65–73. https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7

Palacios, S.A., Del Canto, A., Erazo, J., Torres, A.M., 2021. *Fusarium cerealis* causes *Fusarium* head blight of durum wheat and its associated mycotoxins. International Journal of Food Microbiology 346, 109161. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109161

Palmieri, D., Ianiri, G., Del Grosso, C., Barone, G., De Curtis, F., Castoria, R., Lima, G., 2022. Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases. Horticulturae 8, 577. https://doi.org/10.3390/horticulturae8070577

Pellan, L., 2020. Décryptage des mécanismes impliqués dans le biocontrôle des champignons mycotoxinogènes des céréales, Thèse Université de Montpellier, 2020.

Pellan, L., Dieye, C.A.T., Durand, N., Fontana, A., Strub, C., Schorr-Galindo, S., 2021a. Biocontrol Agents: Toolbox for the Screening of Weapons against Mycotoxigenic Fusarium. JoF 7, 446. https://doi.org/10.3390/jof7060446

Pellan, L., Dieye, C.A.T., Durand, N., Fontana, A., Strub, C., Schorr-Galindo, S., 2021b. Biocontrol Agents: Toolbox for the Screening of Weapons against Mycotoxigenic Fusarium. Journal of Fungi 7, 446. https://doi.org/10.3390/jof7060446

Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., Strub, C., 2020. Commercial Biocontrol Agents Reveal Contrasting Comportments Against Two Mycotoxigenic Fungi in Cereals: *Fusarium Graminearum* and *Fusarium Verticillioides*. Toxins 12, 152. https://doi.org/10.3390/toxins12030152

Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. Arch Toxicol 84, 663–679. https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8

Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms, and animal health risks. Animal Feed Science and Technology, *Fusarium,* and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control, and economic impact 137, 283–298. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.006

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 acclimatized isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. Toxins 12, 478.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Editions TEC & DOC, Paris.

Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F., 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. Crit Rev Microbiol 36, 221–231. https://doi.org/10.3109/10408411003720209

Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P., 2003. Strategies for the Control of Fusarium Head Blight in Cereals. European Journal of Plant Pathology 109, 731–742. https://doi.org/10.1023/A:1026034509247

Pisarčik, M., Hakl, J., Szabó, O., Hrevušová, Z., 2021. Efficacy of variable timing of *Pythium oligandrum* applications on red clover grown under field conditions. Crop Protection 149, 105780. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105780

Pitt, J.I., 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. British Medical Bulletin 56, 184–192. https://doi.org/10.1258/0007142001902888

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and Food Spoilage. Springer US, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6391-4

Pitt, J.I., Miller, J.D., 2017. A Concise History of Mycotoxin Research. J Agric Food Chem 65, 7021–7033. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494

Pitt, R.E., 1993. A Descriptive Model of Mold Growth and Aflatoxin Formation as Affected by Environmental Conditions. J Food Prot 56, 139–146. https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.2.139

Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. Plant Soil 340, 505–520. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8

Porras, M., Barrau, C., Santos, B., Arroyo, F.T., Blanco, C., Romero, F., 2002. Effects of temperature on *in vitro* response of *Trichoderma* strains against strawberry pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn. Plant Prot. Sci. 38, 620–622. https://doi.org/10.17221/10572-PPS

Pradhan, M., Pandey, P., Baldwin, I.T., Pandey, S.P., 2020. Argonaute4 Modulates Resistance to *Fusarium brachygibbosum* Infection by Regulating Jasmonic Acid Signaling. Plant Physiology 184, 1128–1152. https://doi.org/10.1104/pp.20.00171

Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G., 2009. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. Food and Chemical Toxicology, Early Awareness of Emerging Risks to Food and Feed Safety 47, 927–931. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.010

Pritsch, C., Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R., Somers, D.A., Vance, C.P., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum.* Mol Plant Microbe Interact 13, 159–169. https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.159

Proctor, R.H., Desjardins, A.E., McCormick, S.P., Plattner, R.D., Alexander, N.J., Brown, D.W., 2002. Genetic Analysis of the Role of Trichothecene and Fumonisin Mycotoxins in the Virulence of Fusarium. European Journal of Plant Pathology 108, 691–698. https://doi.org/10.1023/A:1020637832371

Raja, M.U., Mukhtar, T., Shaheen, F.A., Bodlah, I., Jamal, A., Fatima, B., Ismail, M., Shah, I., 2018. Climate Change and its Impact on Plant Health: A Pakistan's Prospective. Plant Protection 2, 51–56.

Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2006. Temperature and water activity affect growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. International Journal of Food Microbiology 106, 291–296. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004

Rashad, Y.M., Baka, Z.A.M., Moussa, T.A.A., 2023. Mycotoxins and Their Producers: Diversity, Side Effects and Control, in: Rashad, Y.M., Baka, Z.A.M., Moussa, T.A.A. (Eds.), Plant Mycobiome: Diversity, Interactions and Uses. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–27. https://doi.org/10.1007/978-3-031-28307-9_1

Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. J Bacteriol 154, 1222–1226.

Reboux, G., 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, 1er Congrès Français d'Allergologie 46, 208–212. https://doi.org/10.1016/j.allerg.2006.01.036

Reyneri, A., 2006. The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal. Vet Res Commun 30, 87–92. https://doi.org/10.1007/s11259-006-0018-8

Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. International Journal of Food Microbiology, Mycotoxins from the Field to the Table 119, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019

Ripert, C., 2013. Mycologie médicale. Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Rodríguez, A., Chia, E., Rossi, V., Rodríguez, A., Chia, E., Rossi, V., 2022. Biological control: lessons learned for agroecological transition in Uruguay. Agrociencia Uruguay 26. https://doi.org/10.31285/agro.26.967

Rossi, V., Giosuè, S., Pattori, E., Spanna, F., Del Vecchio, A., 2003. A model estimating the risk of Fusarium head blight on wheat*. EPPO Bulletin 33, 421–425. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2003.00667.x

Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. J Theor Biol 162, 447–463. https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099

Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. International Journal of Food Microbiology 63, 265–273. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00469-4

Rousseau, A., 1996. Mycoparasitism of the Extramatrical Phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 86, 434. https://doi.org/10.1094/phyto-86-434

Samsudin, N. i. p., Magan, N., 2016. Efficacy of potential biocontrol agents for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 under different environmental conditions. World Mycotoxin Journal 9, 205–213. https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1886

Samsudin, N.I.P., Rodriguez, A., Medina, A., Magan, N., 2017. Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, FUM1 gene expression and fumonisin B1 production by

Fusarium verticillioides on maize cobs of different ripening stages. International Journal of Food Microbiology 246, 72–79. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.004

Samuels, G.J., Lieckfeldt, E., Nirenberg, H.I., 1999. *Trichoderma asperellum,* a new species with warted conidia, and redescription of T. viride. Sydowia 51, 71–88.

Sara, R.-S., Ahmed, M., 2023. Occurrence of Toxinogenic Fungi in Livestock Feeds in Eastern Algeria. Journal of Pharmaceutical Negative Results 2491–2498. https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.S02.293

Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2010. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. Journal of The Royal Society Interface 8, 117–126. https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0131

Segaran, G., Sathiavelu, M., 2019. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 21, 101284. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284

Shang, L., Bai, X., Chen, C., Liu, L., Li, M., Xia, X., Wang, Y., 2019. Isolation and identification of a *Bacillus megaterium* strain with ochratoxin A removal ability and antifungal activity. Food Control 106, 106743. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106743

Sharma, M., Tarafdar, A., Ghosh, R., Gopalakrishanan, S., 2017. Biological Control as a Tool for Eco-friendly Management of Plant Pathogens, in: Adhya, T.K., Mishra, B.B., Annapurna, K., Verma, D.K., Kumar, U. (Eds.), Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects: Volume 2: Soil-Microbe-Plant Interaction, Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, pp. 153–188. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7380-9_8

Shay, R., Wiegand, A.A., Trail, F., 2022. Biofilm Formation and Structure in the Filamentous Fungus *Fusarium graminearum*, a Plant Pathogen. Microbiology Spectrum 10, e00171-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.00171-22

Shi, Y., Ouyang, B., Zhang, Y., Zhang, W., Xu, W., Mu, W., 2023. Recent developments of mycotoxin-degrading enzymes: identification, preparation, and application. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 0, 1–16. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220402

Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J., 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. Toxicon 39, 1435–1438. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00259-2

Shternshis, M.V., Belyaev, A.A., Matchenko, N.S., Shpatova, T.V., Lelyak, A.A., 2015. Possibility of biological control of primocane fruiting raspberry disease caused by *Fusarium sambucinum*. Environ Sci Pollut Res 22, 15656–15662. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4763-5

Singh, B.K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J.E., Liu, H., Trivedi, P., 2023. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. Nat Rev Microbiol 1–17. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7

Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., Prabakar, K., 2019. Extreme Environment *Streptomyces*: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? International Journal of Microbiology 2019, e5283948. https://doi.org/10.1155/2019/5283948

Stephens, A.E., Gardiner, D.M., White, R.G., Munn, A.L., Manners, J.M., 2008. Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. Mol Plant Microbe Interact 21, 1571–1581. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1571

Steyn, P., 2012. The Biosynthesis of Mycotoxins: A study in secondary Metabolism. Elsevier.

Stone, A.G., Scheuerell, S.J., Darby, H.M., 2004. Suppression of soilborne diseases in field agricultural systems: organic matter management, cover cropping, and other cultural practices. Soil organic matter in sustainable agriculture 131–177.

Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., Schatzmayr, G., 2013. Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. Toxins 5, 504–523. https://doi.org/10.3390/toxins5030504

Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E.C.Y., Leslie, J.F., 2010. Biogeography and phylogeography of Fusarium: a review. Fungal Diversity 44, 3–13. https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2

Tarazona, A., Gómez, J.V., Mateo, F., Jiménez, M., Mateo, E.M., 2021. Potential Health Risk Associated with Mycotoxins in Oat Grains Consumed in Spain. Toxins (Basel) 13, 421. https://doi.org/10.3390/toxins13060421

Tarkka, M.T., Sarniguet, A., Frey-Klett, P., 2009. Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. Curr Genet 55, 233–243. https://doi.org/10.1007/s00294-009-0241-2

Tian, Y., Tan, Y., Liu, N., Yan, Z., Liao, Y., Chen, J., De Saeger, S., Yang, H., Zhang, Q., Wu, A., 2016. Detoxification of Deoxynivalenol via Glycosylation Represents Novel Insights on Antagonistic Activities of *Trichoderma* when Confronted with *Fusarium graminearum*. Toxins 8, 335. https://doi.org/10.3390/toxins8110335

Tian, Y., Zhang, D., Cai, P., Lin, H., Ying, H., Hu, Q.-N., Wu, A., 2022. Elimination of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) via microbial and enzymatic strategies: Current status and future perspectives. Trends in Food Science & Technology 124, 96–107. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.002

Timmusk, S., Nevo, E., Ayele, F., Noe, S., Niinemets, Ü., 2020. Fighting *Fusarium* Pathogens in the Era of Climate Change: A Conceptual Approach. Pathogens 9, 419. https://doi.org/10.3390/pathogens9060419

Trail, F., Common, R., 2000. Perithecial development by *Gibberella zeae*: a light microscopy study. Mycologia 92, 130–138. https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061137

Trinci, A.P.J., 1971. Influence of the Width of the Peripheral Growth Zone on the Radial Growth Rate of Fungal Colonies on Solid Media. Microbiology 67, 325–344. https://doi.org/10.1099/00221287-67-3-325

Tu, C., 1930. Physiologic specialization in *Fusarium spp*. causing head blight of small grains. Technical Bulletin. Minnesota Agricultural Experiment Station.

Ülger, T.G., Uçar, A., Çakıroğlu, F.P., Yilmaz, S., 2020. Genotoxic effects of mycotoxins. Toxicon 185, 104–113. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.004

Urban, M., Daniels, S., Mott, E., Hammond-Kosack, K., 2002. *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. The Plant Journal 32, 961–973. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01480.x

Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? Current Opinion in Food Science, Food mycology 11, 51–55. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.002

Vallet, M., Vanbellingen, Q.P., Fu, T., Le Caer, J.-P., Della-Negra, S., Touboul, D., Duncan, K.R., Nay, B., Brunelle, A., Prado, S., 2017. An Integrative Approach to Decipher the Chemical Antagonism between the Competing Endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. J Nat Prod 80, 2863–2873. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01185

van der Fels-Klerx, H.J., 2014. Evaluation of performance of predictive models for deoxynivalenol in wheat. Risk Anal 34, 380–390. https://doi.org/10.1111/risa.12103

Van Der Fels-Klerx, H.J., Burgers, S.L.G.E., Booij, C.J.H., 2010. Descriptive modelling to predict deoxynivalenol in winter wheat in the Netherlands. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 27, 636–643. https://doi.org/10.1080/19440040903571762

Van der Fels-Klerx, H.J., Focker, M., De Rijk, T., Liu, C., 2021. Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: results from eight years of field surveys. Mycotoxin Res 37, 183–192. https://doi.org/10.1007/s12550-021-00427-x

van der Linde, E.J., Pešicová, K., Pažoutová, S., Stodůlková, E., Flieger, M., Kolařík, M., 2016. Ergot species of the *Claviceps purpurea* group from South Africa. Fungal Biol 120, 917–930. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.05.006

Váňová, M., Klem, K., Míša, P., Matušinsky, P., Hajšlová, J., Lancová, K., 2008. The content of *Fusarium* mycotoxins, grain yield and quality of winter wheat cultivars under organic and conventional cropping systems. Plant, Soil and Environment 54, 395–402.

Vaughan, M.M., Huffaker, A., Schmelz, E.A., Dafoe, N.J., Christensen, S., Sims, J., Martins, V.F., Swerbilow, J., Romero, M., Alborn, H.T., Allen, L.H., Teal, P.E.A., 2014. Effects of elevated [CO2] on maize defence against mycotoxigenic *Fusarium verticillioides.* Plant, Cell & Environment 37, 2691–2706. https://doi.org/10.1111/pce.12337

Vujanovic, V., Labrecque, M., 2008. Potentially pathogenic and biocontrol Ascomycota associated with green wall structures of basket willow (*Salix viminalis* L.) revealed by phenotypic characters and ITS phylogeny. BioControl 53, 413–426. https://doi.org/10.1007/s10526-007-9092-2

Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2022. Identification, evaluation, and selection of a bacterial endophyte able to colonize tomato plants, enhance their growth and control *Xanthomonas vesicatori*a, the causal agent of the spot disease. Canadian Journal of Plant Pathology 44, 219–234. https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1980822

Walia, A., Putatunda, C., Sharma, R., Sharma, S., Thakur, A., 2021. Biocontrol: A Sustainable Agricultural Solution for Management of Plant Diseases, in: Kaushal, M., Prasad, R. (Eds.), Microbial Biotechnology in Crop Protection. Springer, Singapore, pp. 1–54. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0049-4_1

Wang, J.-H., Ndoye, M., Zhang, J.-B., Li, H.-P., Liao, Y.-C., 2011. Population Structure and Genetic Diversity of the *Fusarium graminearum* Species Complex. Toxins 3, 1020–1037. https://doi.org/10.3390/toxins3081020

Wang, X., Liu, C., van der Fels-Klerx, H.J., 2022. Regional prediction of multi-mycotoxin contamination of wheat in Europe using machine learning. Food Research International 159, 111588. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111588

Weller, D.M., 1988. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. Annual Review of Phytopathology 26, 379–407. https://doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002115

Win, T.T., Bo, B., Malec, P., Khan, S., Fu, P., 2021. Newly isolated strain of *Trichoderma asperellum* from disease suppressive soil is a potential bio-control agent to suppress Fusarium soil borne fungal phytopathogens. J Plant Pathol 103, 549–561. https://doi.org/10.1007/s42161-021-00780-x

Woo, S.L., Hermosa, R., Lorito, M., Monte, E., 2023. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. Nat Rev Microbiol 21, 312–326. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5

Xiao, Y., Dong, Y., Huang, W., Liu, L., 2022. Regional prediction of Fusarium head blight occurrence in wheat with remote sensing based Susceptible-Exposed-Infectious-Removed model. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation 114, 103043. https://doi.org/10.1016/j.jag.2022.103043

Xu, X., Madden, L.V., Edwards, S.G., Doohan, F.M., Moretti, A., Hornok, L., Nicholson, P., Ritieni, A., 2013. Developing logistic models to relate the accumulation of DON associated with Fusarium head blight to climatic conditions in Europe. Eur J Plant Pathol 137, 689–706. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0280-x

Yazar, S., Omurtag, G.Z., 2008. Fumonisins, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. International Journal of Molecular Sciences 9, 2062–2090. https://doi.org/10.3390/ijms9112062

Yergeau, E., Sommerville, D.W., Maheux, E., Vujanovic, V., Hamel, C., Whalen, J.K., St-Arnaud, M., 2006. Relationships between *Fusarium* population structure, soil nutrient status and disease incidence in field-grown asparagus. FEMS Microbiol Ecol 58, 394–403. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00161.x

Yuan, M., Ning, C., Yang, S., Liang, Q., Mou, H., Liu, Z., 2020. A New Cold-Active Glucose Oxidase from *Penicillium*: High-Level Expression and Application in Fish Preservation. Frontiers in Microbiology 11.

Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M.E., Liu, Y., 2014. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLOS ONE 9, e92486. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. Appl Environ Microbiol 56, 1875–1881.

OBJECTIFS DE LA THESE

Au vu de la littérature, l'utilisation d'agents de contrôle biologique (BCAs), en particulier les microorganismes, est une solution intéressante alternative aux produits phytosanitaires chimiques dans la lutte contre les phytopathogènes mycotoxinogènes. Toutefois, l'efficacité de ces BCAs et leur constance dans les conditions naturelles sont souvent remises en cause. Dans un contexte de changement climatique où les fluctuations des conditions abiotiques deviennent de plus en plus remarquables et dont leur impact sur les cultures et les microorganismes sont visibles, il est urgent de repenser les stratégies de lutte biologique. Par ailleurs, de nombreux groupes de recherche ne prennent pas en compte les mycotoxines lorsqu'ils étudient les stratégies de lutte biologique, bien que la production de mycotoxines par des agents pathogènes soit d'une importance économique. Ces études se limitent souvent aux effets fongicides ou fongistatiques des BCAs, alors que l'effet des BCAs sur la production de mycotoxines est souvent négligé. La faible présence de BCAs disponibles dans le commerce contre les *Fusarium* pathogènes notamment *Fusarium graminearum,* peut être due à de nombreux facteurs (efficacité instable de la lutte biologique dans les conditions de terrain, conditions strictes de stockage et de transport des BCAs, complexité de l'enregistrement, mécanismes de lutte biologique non identifiés) mais aussi aux changements de comportement des pathogènes cibles causés par les fluctuations du climat. Le fait que les BCAs soient exclusivement sélectionnés sur leur performance *in vitro* au laboratoire, cause souvent leur désavantage lorsqu'ils sont déployés en milieu naturel. De nombreux éléments mécanistiques restent à élucider pour proposer des leviers d'optimisation du biocontrôle des souches fongiques mycotoxinogènes. Ainsi, l'objectif principal de ma thèse est d'élucider les mécanismes d'interactions entre *Fusarium graminearum*, différents agents de contrôle biologique et le blé dans des conditions de changement climatique afin de proposer des leviers d'optimisation plus efficaces et plus durables de leur utilisation. Pour se faire, plusieurs objectifs ont été fixés :

• i/ Comprendre comment les facteurs abiotiques (température, humidité relative) impactent le comportement des BCAs, de *F. graminearum* et leur interaction ? (*in vitro, in spicula* et *in planta*).

• ii/ Comprendre comment les facteurs abiotiques et biotiques impactent la mycotoxinogenèse de *F. graminearum* (seul et confronté à différents BCAs) ?

• iii/ Proposer des modèles de simulation de croissance et de production de mycotoxines qui permettront de se projeter dans des futurs proche, moyen et lointain pour une prévention efficiente.

• iv/ Contribuer à l'élucidation des mécanismes d'action de chaque BCA vis-à-vis de *F. graminearum* en fonction de différentes conditions de température et d'humidité relative.

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

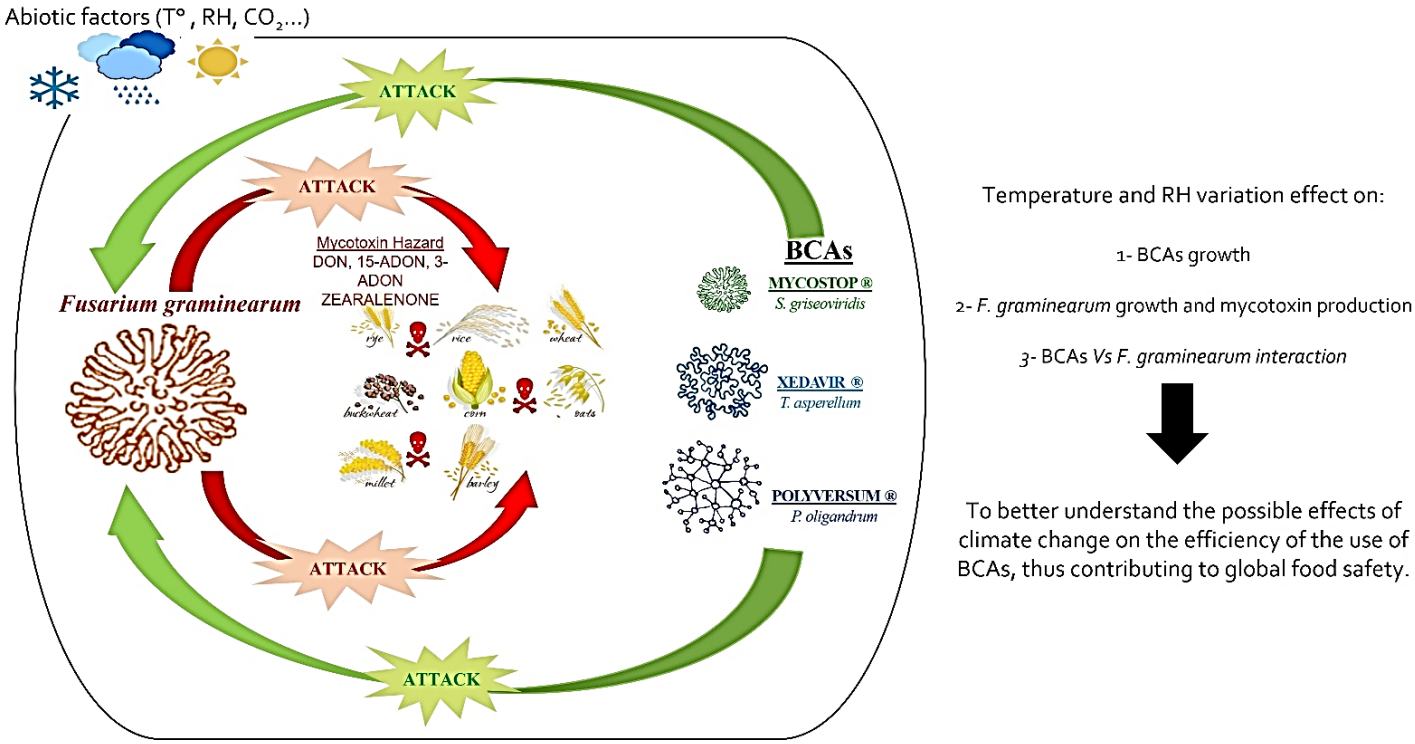
Chapitre I

Partie 1

Impacts of abiotic factors on the growth of three commercial biological control agents, on the growth and mycotoxinogenesis of *Fusarium graminearum* and on their interaction

Ce premier chapitre a pour objectif de comprendre comment les variations de température et d'humidité pourraient impacter le comportement du pathogène *Fusarium graminearum* (sa croissance et sa production de mycotoxine) mais aussi la croissance des BCAs et leur efficacité vis-à-vis du pathogène.

In vivo, les interactions entre les pathogènes et leurs plantes hôtes ainsi que l'application de BCAs se déroulent dans un environnement complexe soumis à différentes contraintes abiotiques dont la température, l'humidité, les pluies, le CO_2 atmosphérique…
Dans ce contexte, les microorganismes déploient toute leur énergie pour s'adapter et se maintenir, ce qui rend plus complexes leurs interactions.



Résumé graphique du contexte général et des objectifs de la première étude.

Dans une première partie, des confrontations *in vitro* ont été mises en place sous différentes températures et humidités relatives pouvant mimer les conditions d'infections au champ.
Les résultats de cette première partie permettront de choisir des conditions favorables aux BCAs (c'est-à-dire dans lesquelles ils gardent leur efficacité) et des conditions qui leurs sont défavorables (en sorte qu'ils sont inefficaces face au pathogène). Des confrontations sur épillet de blé détachés et sur plante entière seront mises en place dans les conditions précédemment sélectionnées. L'objectif sera d'identifier les facteurs qui permettent aux BCAs de conserver leur efficacité non seulement *in vitro* mais aussi sur épillets et plante.

Impacts of abiotic factors on the growth of three commercial biological control agents, on the growth and mycotoxinogenesis of *Fusarium graminearum* and on their interaction

Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Caroline STRUB [1], Angélique FONTANA [1]

[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France

[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France - Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France

Corresponding author: Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE (cheikhatdieye@gmail.com)

Abstract:

Evolving climatic conditions impact the behavior of microorganisms. The lack of efficiency of beneficial microorganisms against pathogens can be due to these evolving abiotic factors more favorable to the development and adaptation of pathogens. It is therefore of great interest to understand their impact (especially T° increase and RH variation) on pathogenic and non-pathogenic microorganisms. This work aimed to examine the possible effects of growing T° (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) and RH (40%, 50%, 60% and 80%) on the growth and mycotoxin production (DON and ZEN) of *F. graminearum*, on the growth of three commercial biocontrol agents (BCAs) (Mycostop®, Xedavir® and Polyversum®) and on the pathogen-BCA interaction.

Results demonstrated that BCAs have contrasting impacts on the growth and mycotoxinogenesis of *F. graminearum* depending on abiotic factors. At 25°C and regardless of RH, commercial BCAs limits DON production by *F. graminearum*, but at 30°C and intermediate RH, Xedavir® is no longer effective. The ability of Xedavir® to control the production of ZEN production by *F. graminearum* is also affected by abiotic factors. However, the growing temperature has an opposite effect on its ability to control the accumulation of ZEN. Polyversum® oomycete is the BCA with the most resilient efficacy against *F. graminearum* toxinogenesis under the different abiotic factor.

This work provides new knowledge of the effect of these abiotic parameters on the interaction between BCA and *F. graminearum*, especially on the production of mycotoxins. It paves the way to the development of efficient and resilient mycotoxin biocontrol strategies using beneficial microorganisms against *F. graminearum*, thus contributing to global food security.

Keys words: abiotic factors, BCAs, *F. graminearum*, temperature, humidity, mycotoxins

I. Introduction

Global warming is unequivocal and since the 1950s. Projections based on all scenarios, are predicted an increase in surface temperature of ~ 4 °C or more over the next century, as well as an increase in the frequency and duration of extreme climatic events like heat waves (1). In response to ongoing climate disruption, many species have altered their geographic distribution, seasonal activities, migration patterns, abundance, and interactions with other species (2–4). Interactions between plants, beneficial microorganisms and fungal pathogens are therefore influenced by environmental conditions, and weather conditions are key to the distribution of pathogens and the efficiency of biocontrol agents (BCAs). Therefore, environmental conditions will affect the distribution areas of crop pathogens and/or cause pathogen populations to adapt (5–10). Thus, it may result in a change in organisms' behavior with different biological characteristics that may eventually lead to more damaging epidemic dynamics in crops with a lack of efficacy of BCAs. A general trend of increasing average temperatures is predicted, with direct effects of abiotic factors on pests or BCAs efficiency (11).

Cereal crops are not immune to these global changes. They are one of the most cultivated plant families in the world. Unfortunately, these crops are too often attacked by pathogens that compromise the production before and after harvest. Some of these phytopathogens can produce mycotoxins and reduce the yield and nutritional properties of grains. Mycotoxins are small molecules resulting from the secondary metabolism of certain fungi. Among mycotoxins fungi, the genus Fusarium is the most prevalent and represents a significant risk (12). *F. graminearum* can produce deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl-deoxynivalenol (3-ADON), 15-Acetyl-deoxynivalenol (15-ADON) and zearalenone (ZEN). These mycotoxins are part of the natural contaminants of food, are difficult to degrade by living organisms and very stable during the transformation processes (12).

Nowadays, agricultural productions are subject to a scissor effect with, on one side, highly evolving climatic conditions favorable to microbial development and, on the other side, a societal and political wish to reduce the use of agrochemical products (13). This is particularly the case for wheat crops, which must deal with fungal diseases that impact yields and contaminate seeds and products, against which chemical pesticides are systematically used. It is urgent to propose natural alternatives to conventional pesticides for field crops. Among these alternatives, biocontrol remains an interesting solution to be made more effective and efficient. Biological control agents (BCA) can able to control wheat pathogens by several mechanisms (13,14). These mechanisms can be direct, as the induction of resistance, the competition for

space or nutrition, the production of antibiotics and parasitism. Also, it can be indirectly related to the enhancement of the plant's health improving its ability to fight these aggressors, as mechanisms of stimulation of growth, or of easy acquisition of nutrients. But it should be noted that biocontrol products, precisely the beneficial microorganisms, are often considered inefficient under some environmental conditions. This lack of efficiency can be due to very evolving climate conditions more favorable to the development and adaptation of pathogens than BCAs. Global warming has generated a lot of discussion and research on the possible effects on agroecosystems, the whole world faces to a high risk of mycotoxin contamination (15,16). The predominance of *F. graminearum* or *F. culmorum* is determined to a wider extent, by climatic factors, in particular temperature and humidity and can therefore change drastically in different geographical areas (17–20). The profile of *Fusarium* mycotoxigenic species on wheat in Europe is continuously changing in Northern, Central and Southern Europe with a worrying increasing contamination of *F. graminearum* in Central and Northern Europe (21). It would therefore be necessary to have BCAs capable of interacting effectively with *F. graminearum* under various environmental conditions.

The aim of this study was to identify the optimal temperature and relative humidity conditions for the efficiency of three commercial biological control agents (BCAs) (*Streptomyces griseoviridis*, *Trichoderma asperellum* and *Pythium oligandrum*) against *F. graminearum*. This would help growers to select one of them and the interest to use them regarding the weather observed in their fields at stages of the plant and fungal life cycle that are critical for the infection and production of mycotoxins. An experimental design was set up to determine the effects of different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) and relative humidities (40%, 50%, 60% and 80%) on the growth of the three commercial biological control agents, on the growth and mycotoxinogenesis of the toxigenic plant pathogen *F. graminearum* and on their interaction. The cocultivations were carried out in an experimental device mimicking mycelial development on the plant in which part of the mycelium was in contact with a medium with high water activity while the aerial mycelium was exposed to controlled ambient relative humidity.

II. Material and Methods

2.1. Micro-organisms and culture conditions

2.1.1. *Fusarium graminearum*

F. graminearum strain BRFM 1967 was used (CIRM, University of Aix-Marseille, Marseille, France), and chosen for its high capacity to produce mycotoxins. Isolated from a

wheat plant, it has a deoxynivalenol/15-Acetyldeoxynivalenol/3-Acetyldeoxynivalenol (DON/15-AcDON/3-AcDON) chemotype. The strain was maintained on potato dextrose agar (PDA: BD Difco, Sparks, MA, USA) under paraffine oil at 4°C and actively grown on PDA at 25 °C for 7 days for spore production. Spore suspension was prepared from solid medium in sterile water-Tween (wT, 0.01%) and filtered with carded cotton.

2.1.2. Commercial biological control agents (BCA)

Three commercial biological control agents (BCA) were selected for their contrasting characteristics (22). All strains were isolated from their commercial product with a classical microbial isolation protocol (serial dilution and multiple striation inoculation), on an appropriate medium (supplemented with 0.01% tetracycline for *Pythium oligandrum* only). BCAs were stored under spore form in glycerol solution (15%/-80 °C) and in commercial product aliquots (4 °C). Strains were actively grown on ISP4, PDA and V8 respectively for *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) and *Pythium oligandrum* (Polyversum®) at 25 °C for 7 days for spore production. For the rest of the study, strains isolated from commercial products were designated using their commercial name: Mycostop® for *S. griseoviridis*, Xedavir® for *T. asperellum*, and Polyversum® for *P. oligandrum*. All BCAs could be used against all cereal's pathogens fungi but only Polyversum® is recommended specially for *F. graminearum* treatment.

2.2. *In vitro* confrontation

2.2.1. Experimental design

An experimental design was set up for *in vitro* confrontations. Four temperatures (20°C, 25°C, 30°C, and 33°C) and 4 relative humidity (40%, 50%, 60%, and 80%) were chosen, on intervals where each of the microorganisms could evolve with climate change, as explanatory variables, resulting in 16 treatments that would represent the different abiotic conditions. Two bioclimatic enclosures (© DS_Memmert ICH260 climatic chamber – fr/ Memmert D39263/D39264 – DIN ISO 9000 ff, DIN 1319, DIN 10012) were used to adjust the different temperatures and relative humidity. The chamber ventilation has been set to its lowest level.

The variables to be explained (measured variables) were the growth of BCA and *Fusarium graminearum* and its mycotoxin production (DON and ZEN).

For the allocations, each treatment was applied on 5 experimental units with 5 repetitions each. *F. graminearum* was confronted with each BCA and the pathogen alone and each BCA alone were the control.

2.2.2. Culture media and growth evaluation

On Czapeck yeast agar (CYA) medium, each BCA and the pathogen were inoculated in a Petri dish at the same distance from the center of plate. The pathogen and BCAs were inoculated with the spore suspension except Polyversum®, which was inoculated with 7- day plugs (5 mm in diameter). The BCAs (5 µL * 10^5 spores mL^{-1} or plug) and the pathogen (45 mm from BCA, 5 µL * 10^4 spores mL^{-1}) were inoculated at the same time. Plates were incubated at the defined temperature and relative humidity in the dark for 12 days using bioclimatic enclosure. Microorganisms were grown on Petri dish placed in a climatic chamber. This experimental set-up mimicked the hyphal development on plants. Part of the fungal mycelium was in contact with high water activity medium although the aerial mycelium was exposed to ambient atmosphere where RH was controlled. The water activity (a_w) of the culture media was measured with an a_w-meter (GBX, model FA-st / 1) to ensure that the water activity (a_w) in the culture media did not fall below 0.98 during the 12 days of the experiment. Plates inoculated with the pathogen alone and BCAs alone were used as control treatment. Petri dishes were photographed on days 3, 5, 7, 10 and 12 and the colony area of each BCA/pathogen was measured in cm^2 using ImageJ software (1.52a, Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, 2018). Values were used to create a growth curve. Each BCA/pathogen confrontation and control were set up in quintuplicate for each analyzed day and two independent repetitions of the test were done.

2.2.3. Mycotoxin extraction and analysis

After growth evaluation, each confrontation plate was submitted to a mycotoxin analysis. The extraction procedure described by (22) was used with some modifications (no purification steps). Half petri dish was sampled by cutting along the line formed by the two inoculation points, and finely cut and weighed. *F. graminearum* confronted or alone, 30 mL of acetonitrile/water/acetic acid (79:20:1, v/v/v) were added and samples were homogenized by mechanical agitation for 20 minutes at 250 rpm. Then samples were diluted 1:50 in water/acetic acid (99.5:0.5, mobile phase A of analyzer) and filtered with a CA filter (0.45 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

Mycotoxin detection and quantification described bye (23) were achieved using an Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled with a mass spectrometer (8040, Shimadzu, Tokyo, Japan). LC separation was performed using a Phenomenex Kinetex XB Column C18 (50 mm * 2 mm; 2.6 µm particles) at 50 °C, with an

injection volume of 50 µL. Mobile phage composite was (A) 0.5% acetic acid in ultra-pure water and (B) 0.5% acetic acid in isopropanol (HPLC MS grade, Sigma, St Louis, MO, USA), and the mobile phase flow rate was 0.4 $mL.min^{-1}$. The mass spectrometer was operated in electrospray positive (ESI+) and negative (ESI-) ionization mode, and two multiple reaction monitoring (MRM) transitions for each analyte were monitored for quantification (Q) and qualification (q). All data were analyzed using LabSolutions Software (v5.91/2017, Shimadzu, Tokyo, Japan, 2017). Limits of detection or quantification (LOD/LOQ in ng mL^{-1}, respectively) for each mycotoxin were: DON (5/15), 15-ADON (5/15), ZEN (0.5/1.5). Mycotoxin levels were expressed in ng. g^{-1} of medium or $ng.cm^{-2}$, respectively for global and specific mycotoxin production. Values were used to create global and specific mycotoxin production curve. Each BCA/pathogen confrontation and control mycotoxin analysis was set up in quintuplicate for each measurement day, and two independent repetitions of the test were done.

2.3. Data expression and statistical analysis

With the aim of considering complete growth and/or mycotoxin production kinetics, and not only a final point, the area under the growth/mycotoxin production curves were calculated for the confrontation test.

Statistical data analysis was performed with R Software (3.4.4, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017) and Minitab21 Statistical Software (Quality Plaza, 1829 Pine Hall Rd, State College PA 16801-3210, USA) was used for figures. Normality and homogeneity of variances were checked with the Shapiro-Wilk test (with Holm-Bonferroni correction) and Levene's test, respectively. For each microorganism (BCA/pathogen), the effect of abiotic factors was tested with a one-way ANOVA and multiple comparisons of means were done with Tukey's HSD pairwise comparison test ($\alpha = 0.05$).

III. **Results**

3.1. Impacts of abiotic factors on the growth of *F. graminearum* and BCAs

The effect of temperatures (A), RH (B) and RH and temperature combinations (C) on the growth kinetic of the different microorganisms is represented on Figure 1. Figure 1A summarizes for each temperature, all growth data obtained at all tested RH. Figure 1B summarizes for each RH, all growth data obtained at all temperatures. The highest temperature (33°C) inhibits *F. graminearum* growth (Figure 1.AI). The growth of the BCA increases with increasing temperature (Figure 1.AII, 1.AIII and 1.AIV). These results indicate that increasing temperatures negatively affect the growth of the pathogen and positively the BCAs growth.

However, relative humidity variation (B) has no effect on the growth of the BCAs or *F. graminearum*.

The comparison of the effect of the combination of RH and temperature on growth of BCAs and *F. graminearum* exhibits that considered together, these factors have the same effect on growth as temperature alone (Figure 1.CI 1.CII 1.CIII and 1.CIV). Maximum growth of the pathogen was observed at 25°C/40%, 50%, 60% and 80% RH (Figure 1.CI) confirming that temperature is more influent than ambient humidity on microbial growth.

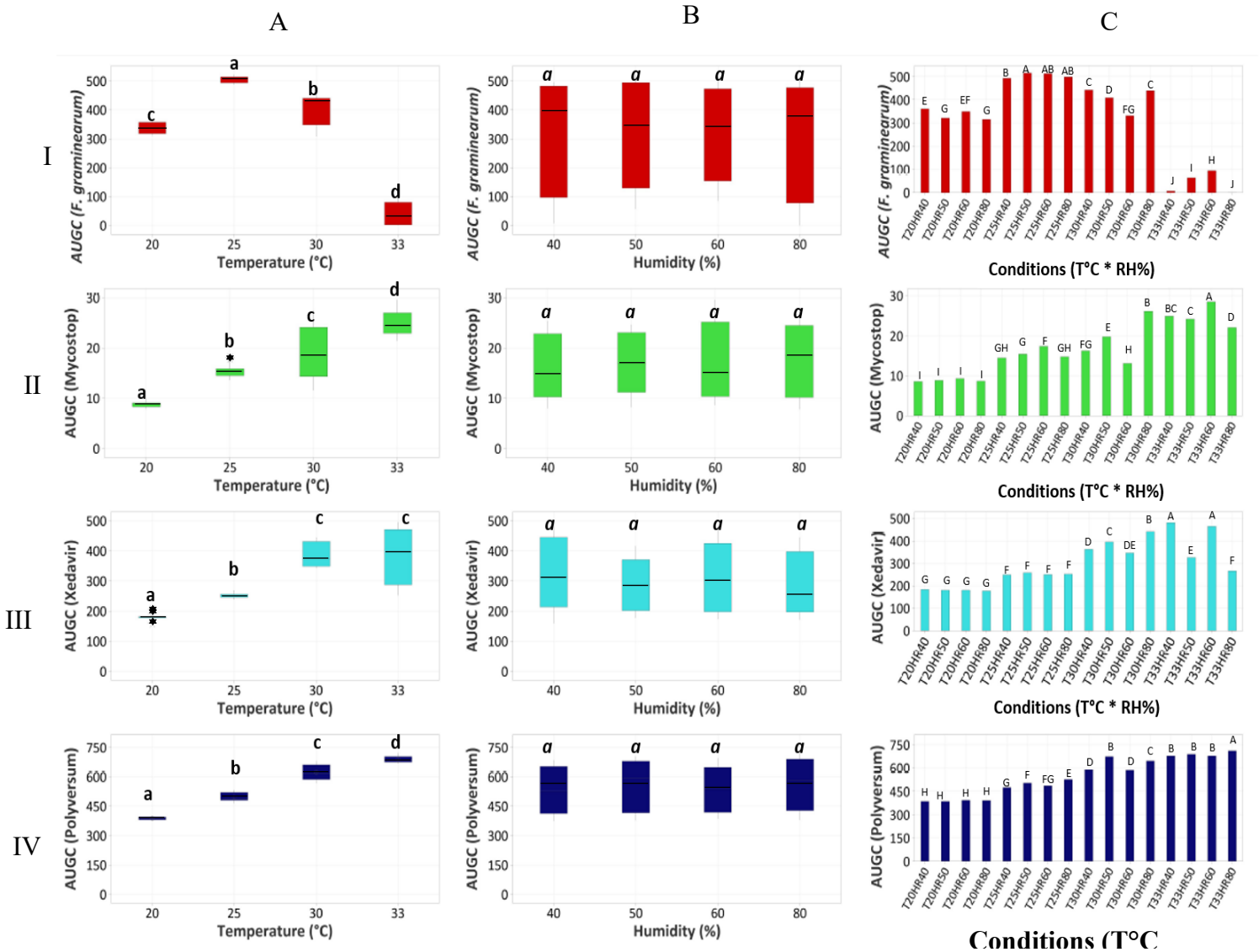


Figure 1. Comparative effects of abiotic factors on the growth of BCA and *Fusarium graminearum*. All microorganisms were cultivated alone on CYA medium for 12 days. (A) impact of temperature (T°) on the growth of (AI) *F. graminearum*, (AII) *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), (AIII) *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) and (AIV) *Pythium*

oligandrum (Polyversum®). (B) impact of relative humidity (RH) on the growth of (BI) *F. graminearum*, (BII) Mycostop®, (BIII) Xedavir® and (BIV) Polyversum®. (C) combination of T° and RH on the growth of (CI) *F. graminearum*, (CII) Mycostop®, (CIII) Xedavir® and (CIV) Polyversum®. Growth levels are expressed in the area under growth curve (AUGC). ANOVA test, *p-value* <0.05, Growth comparisons A (a, b, c, d), B (a) and C (A, B, C…).

3.2. Impacts of temperature variation and BCAs on the growth of *F. graminearum*

Results presented in Figure 1 indicated that temperature was the most influential abiotic factor for both the growth of the pathogen and BCAs. The effect of temperature as well as the BCAs face-off on *F. graminearum* growth has been examined (Figure 2). All BCA treatments significantly impacted the growth of *F. graminearum* at 20°C, 25°C and 30°C (Figure 2A, 2B and 2C), especially Polyversum® and Xedavir® which reduced the fungal growth respectively by 80% and 50%. At 33°C, Polyversum® was the only BCA to significantly reduce the growth of *F. graminearum*. Compared to the low and medium temperatures, *F. graminearum* cultivated alone exhibited a reduced growth at 33°C. Overall, BCAs appeared to be less effective in limiting the pathogen development (Figure 2.D).

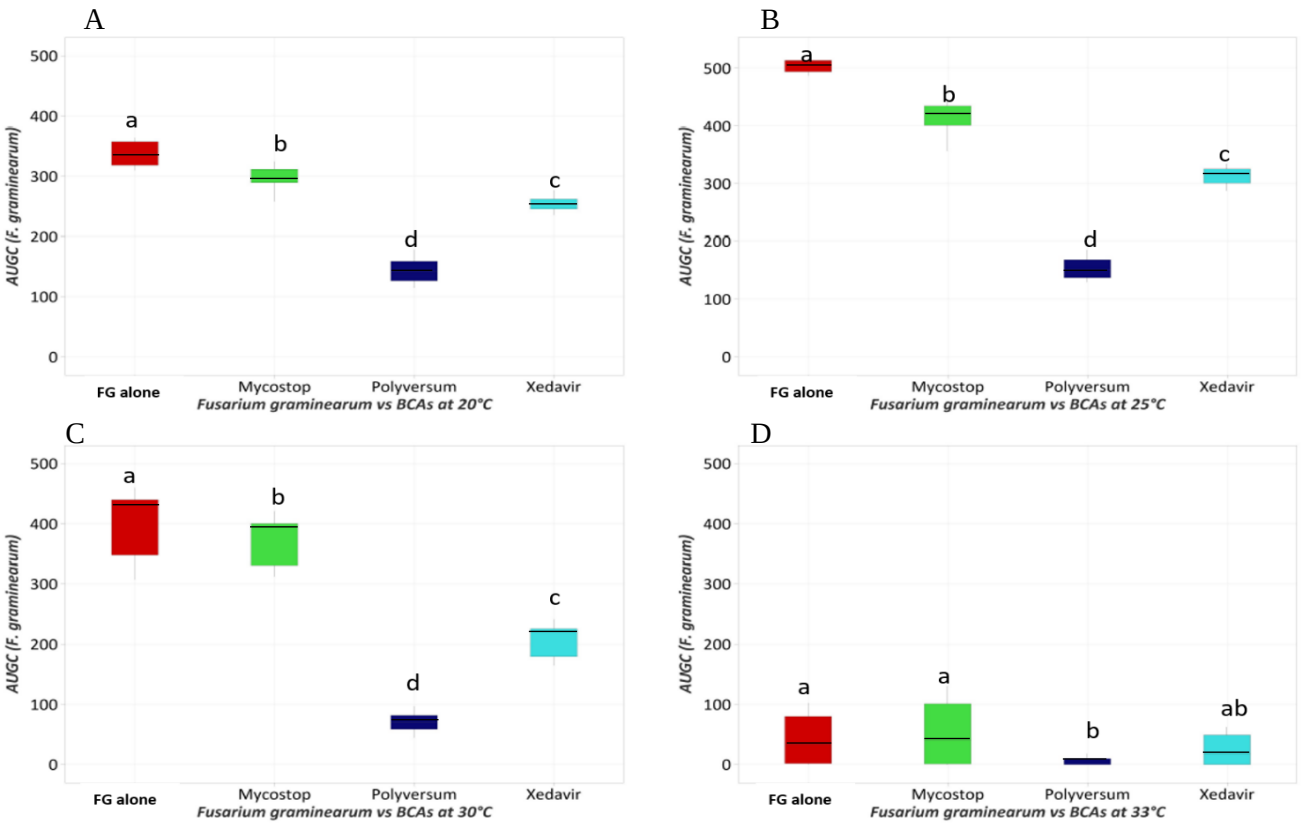


Figure 2. Comparative effects of BCA treatments (Mycostop®: *Streptomyces griseoviridis*, Xedavir®: *Trichoderma asperellum* and Polyversum®: *Pythium oligandrum*) and temperature

(T°) variation on the growth of *F. graminearum*. All confrontation were performed on CYA medium for 12 days. (A) at 20°C, (B) at 25°C, (C) at 30°C and (D) at 33°C. Growth levels are expressed in the area under growth curve (AUGC). ANOVA test, *p-value* <0.05, Growth comparisons (a, b, c, d).

3.3. Impacts of abiotic factors on mycotoxin (DON & ZEN) production of *F. graminearum*

In vitro experiments under different abiotic factors (T° and RH) were monitored over 12 days. The kinetics of specific production of fusariotoxins over time was thus determined under the different abiotic conditions previously mentioned. From these data, the area under the specific DON/ZEN production curve (AUSDPC/AUSZPC) were calculated (Figure 3). Results revealed the effect of temperatures (Figure 3A & 3C) RH (Figure 3B & 3D) and RH and temperature combinations on the fusariotoxins specific productions (Figure 3E & 3F). Figure 3A and 3C summarize for each temperature, all mycotoxins production data obtained at all tested RH. Figure 3B and 3D summarizes for each RH, all mycotoxins production data obtained at all temperatures. Specific mycotoxin productions of *F. graminearum* are presented in Figure 3A, B & E for DON and in Figure 3C, D & F for ZEN.

F. graminearum specifically produced the highest amount of DON at 25°C. This production decreased at the other temperatures and was almost zero at 33°C (Figure 3A). In contrast to DON, ZEN production is highest at 30°C (Figure 3C). RH factor considered independently of temperature had no effect on mycotoxins production (Figure 3 B & D). However, by examining the effect of the combination of the two factors on specific production, it was noticed that DON production increased significantly when *F. graminearum* grown at the highest RH (80%) and at 25°C (Figure 3E). This revealed that in the experimental conditions of this study, ambient humidity had a significant impact on the mycotoxinogenesis of *F. graminearum* contrary to its growth. High temperatures (30°C, 33°C/40%, 50% and 60%) stimulated ZEN production and inhibited DON production except in the most extreme conditions (33°C/40%). *F. graminearum* was not able to grow at 33°C/80% explaining the no detection of mycotoxins at these abiotic conditions.

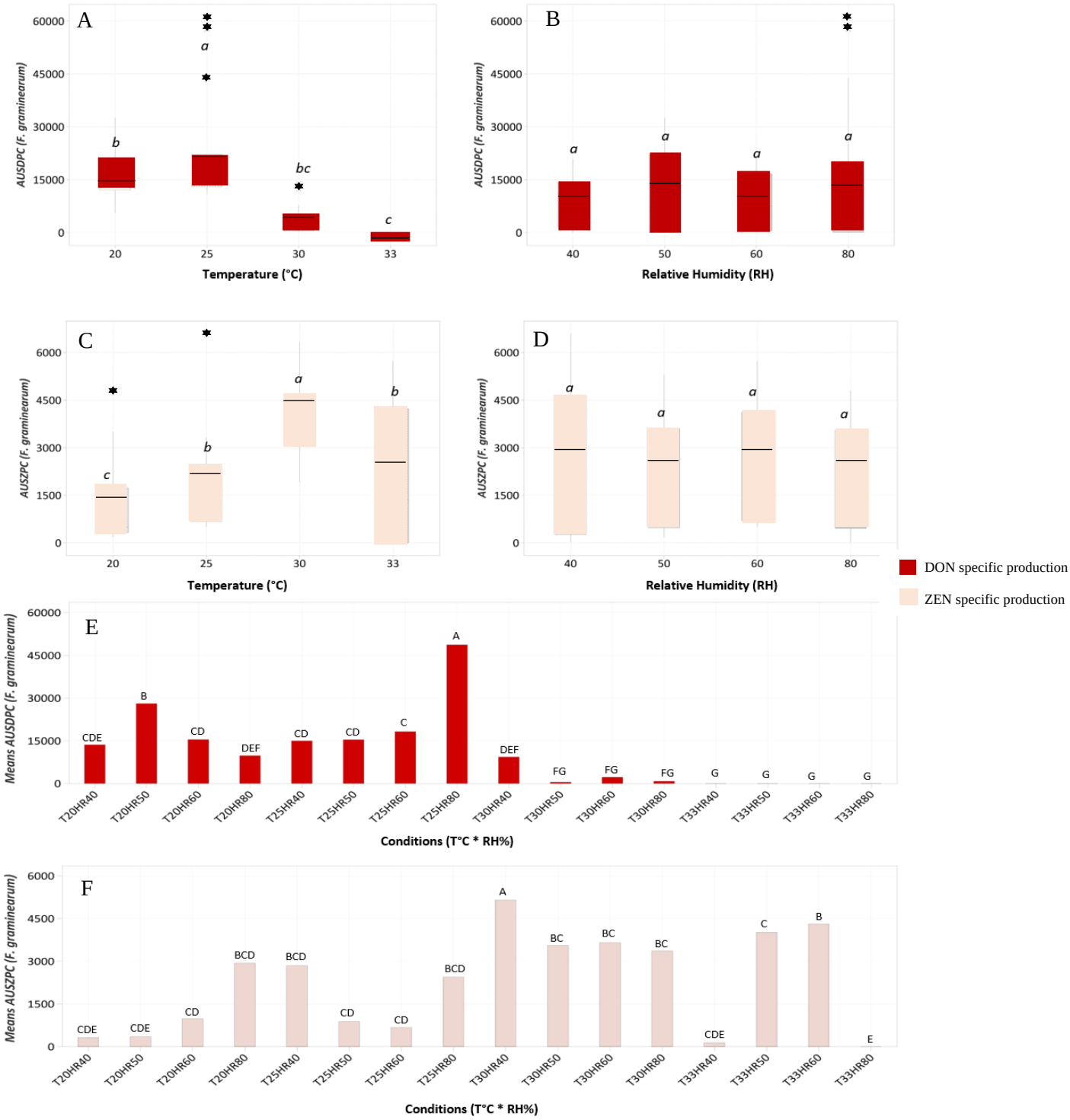


Figure 3. Comparative effects of abiotic conditions on mycotoxinogenesis of *F. graminearum:* (A & C) impact of temperature (T°) variation alone on DON (A) and ZEN (C) specific production. (B & D) impact of RH variation alone on DON (B) and ZEN (D) specific production. (E & F) combine T° and RH on mycotoxin specific production of *F. graminearum*. (E) DON production and (F) ZEN production. All tested conditions were performed on CYA medium for 12 days. Mycotoxin specific production levels are expressed in the area under specific DON/ZEN production curve (respectively AUSDPC and AUSZPC). ANOVA test, *p*-

value <0.05. Mycotoxin specific production comparisons A, B, C & D (a, b, c, d), E & F (A, B, C…).

3.4. Impact of abiotic and biotic (BCAs) factors on mycotoxin production of *F. graminearum*

The impact of BCAs treatments at 25°C, 30°C/40%, 60% and 80% on fusariotoxins production are represented in Figures 4 and 5. DON production is significantly inhibited by all the BCAs at 25°C, any RH confounded, even at RH 80% where production is higher (Figure 4. I, II and III), especially Polyversum which is the only BCA that totally inhibits DON and ZEN productions (Figure 4 and 5). At 30°C, RH affects the efficiency of the BCAs. At 30°C/40% RH (Figure 4. IV), no BCA significantly controls DON production. While at 30°C/60% & 80% RH (Figure 4. V and VI), only Polyversum® and Mycostop® are effective to control DON production.

In contrast to DON, ZEN production increases with the most stressful conditions (low or high temperature: 20°C/30°C, low RH: 40%). At 25°C (Figure 5. *I*, *II* and *III*), only Polyversum® significantly controls ZEN production except at 25°C/80% where Xedavir® is also effective. At 30°C (Figure 5. *IV*, *V* and *VI*), all BCAs significantly controlled ZEN production but Polyversum® was more effective. Depending on the conditions, Mycostop® and Xedavir® have different levels of efficacy, between 25°C/40% and 30°C/60% where similar ZEN production is observed when the pathogen is alone, Xedavir® and Mycostop® are more effective at 30°C/60%. Between 25°C and 30°C, Xedavir® has no effect on DON production at 30°C regardless RH. Also, for the same RH, at different temperatures, the ability of BCAs to limit the mycotoxins accumulation differs. At 40% RH and 25°C, DON production is inhibited by all BCAs unlike at 40% RH and 30°C, where none of the BCAs control DON production. The growing temperature of the BCAs also influences their ability to control the accumulation of ZEN. At 40% RH and 60% RH with 25°C, ZEN production is significantly inhibited by Polyversum® only unlike at 40% RH and 60% RH with 30°C where all the BCAs significantly controlled ZEN production. The impact of the growing temperature is, however, the opposite. i.e., the increase in temperature seems to improve the efficiency of the BCAs to control ZEN while a decrease in growing temperature tends to improve efficiency of BCAs toward DON accumulation.

These results show that, according to the BCA, its behavior depends on the conditions of its environment but also on the behavior of the pathogen. When there is a high production of DON (25°C), BCAs are more efficient in controlling DON at the expense of ZEN control. The same scenario is observed when there is a high production of ZEN (30°C).

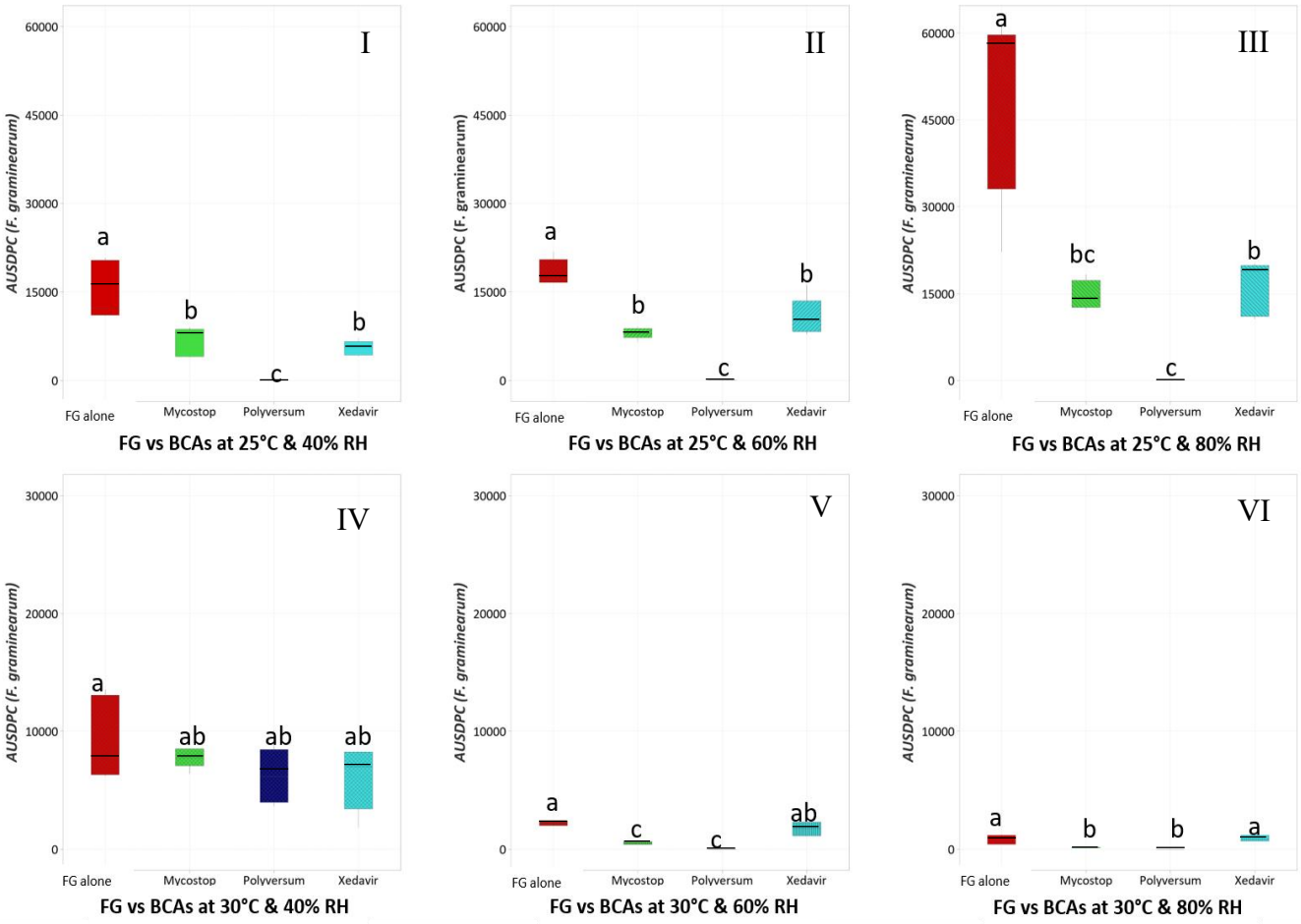


Figure 4. Comparative effects of BCAs treatments (Mycostop®: *Streptomyces griseoviridis*, Xedavir®: *Trichoderma asperellum* and Polyversum®: *Pythium oligandrum*), temperature (T°) variation (25°C and 30°C) and relative humidity (RH) variation (40%, 60% and 80%) on DON specific production of *F. graminearum*. All confrontation were performed on CYA medium for 12 days. (I) at 25°C/40% RH, (II) 25°C/60% RH, (III) 25°C/80% RH, (IV) 30°C/40% RH, (V) 30°C/60% RH and (VI) at 30°C/80% RH. DON specific production levels are expressed in the area under specific DON production curve (AUSDPC). ANOVA test, *p-value* <0.05. DON specific production comparisons (a, b, c, d).

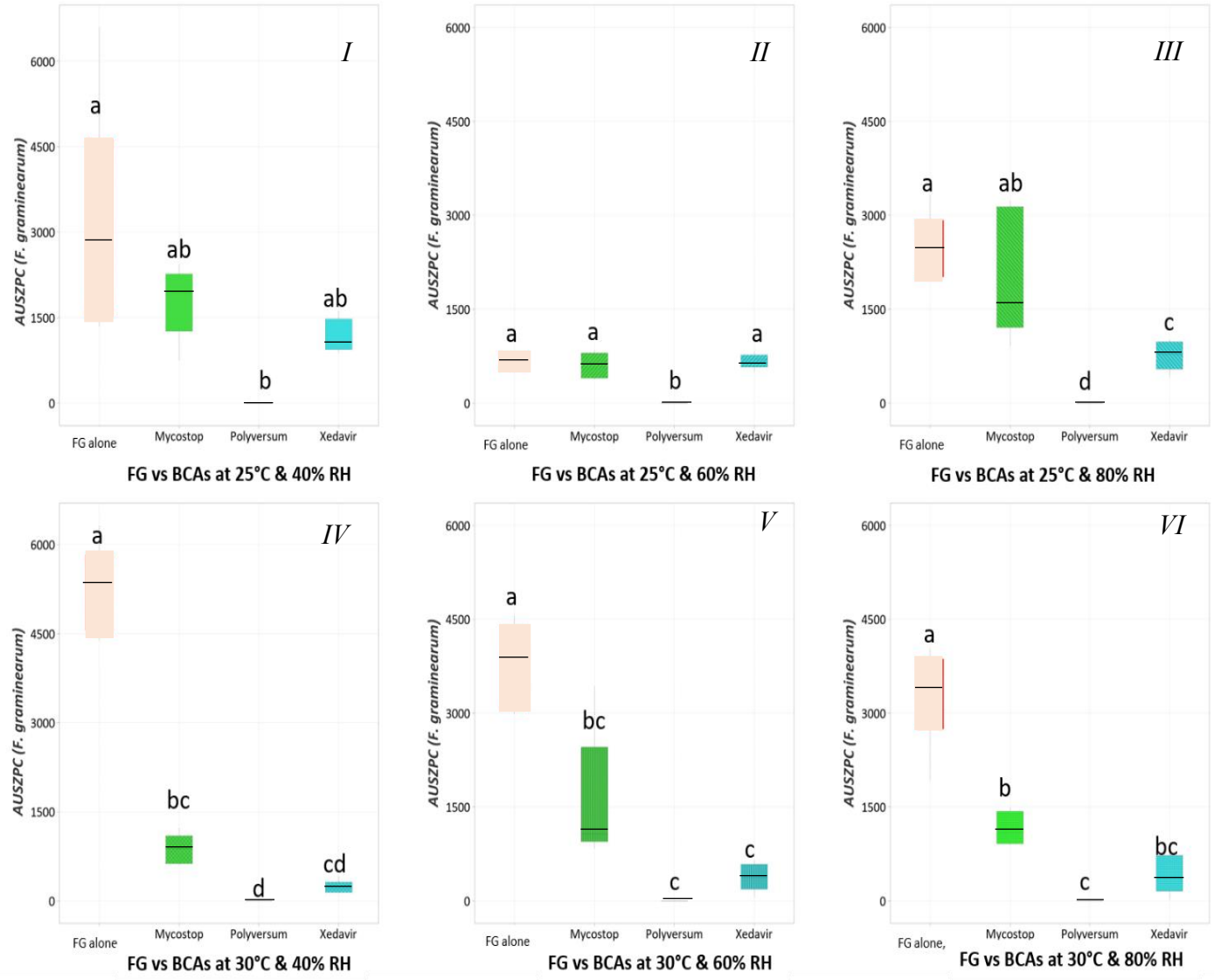


Figure 5. Comparative effects of BCAs treatments (Mycostop®: *Streptomyces griseoviridis*, Xedavir®: *Trichoderma asperellum* and Polyversum®: *Pythium oligandrum*), temperature (T°) variation (25°C and 30°C) and relative humidity (RH) variation (40%, 60% and 80%) on ZEN specific production of *F. graminearum*. All confrontation were performed on CYA medium for 12 days. (*I*) at 25°C/40% RH, (*II*) 25°C/60% RH, (*III*) 25°C/80% RH, (*IV*) 30°C/40% RH, (*V*) 30°C/60% RH and (*VI*) at 30°C/80% RH. ZEN specific production levels are expressed in the area under specific ZEN production curve (AUSZPC). ANOVA test, *p-value* <0.05. ZEN specific production comparisons (a, b, c, d).

IV. **Discussion**

Temperature and humidity are the main climatic factors influencing the development of *Fusarium* cereals diseases, although the influence of these climatic factors is not independent

of other environmental, biotic and host factors. Varying the temperature in a simple model ecosystem produces changes in the community structure of *Fusarium* species that mimic those found along climatic temperature and rainfall gradients (24). Germination, growth, mycotoxin production and competition between *F. graminearum* and other antagonistic microorganisms are also dependent on these environmental factors. It was in this context that this study demonstrated that an increase in temperature (above 25°C) would benefit BCAs with an increase in their growth, contrary to the pathogen *Fusarium graminearum* whose growth decreases (below and above 25°C) with contrasting rates of mycotoxin production depending on temperature and relative humidity (RH). This result could be compared with the phenomenon of adaptation of wide distribution species and could be the case for most commercial BCAs considered ineffective under certain environmental conditions. The adaptation of microorganisms can be tested by measuring the performance of species (growth, mechanisms of action...) in their optimal and suboptimal growth conditions (25). At the laboratory level, this approach allows to directly test the role of one or more environmental factors *in vitro*, such as temperature, relative humidity (RH) or water activity (a_w), amount of atmospheric CO_2, to see how species behave on suboptimal conditions (26). The experimental approach of this study allowed us to see, through the different conditions tested, that it is the variation in temperature that most influences the growth of the species. These results are in agreement with several studies (21,27–31) on the impacts of abiotic factors on *Fusarium graminearum* but with a_w instead of relative humidity. Temperature, humidity, light intensity, and wind are the critical climatic factors affecting the production and dispersal of asexual conidia and sexual ascospores of *Fusarium*. Hence these factors critically influence the propagation and survival of *Fusarium* fungi (32). Relative humidity has no effect on the growth (colony surface area) of pathogens and BCAs. There are several possible hypotheses to explain this. Relative humidity could affect other growth parameters such as mycelial density, sporulation, or dry weight. These parameters were not measured in this study, and it would be interesting to measure them in the future to verify these hypotheses. However, relative humidity showed a pronounced effect on mycotoxin production. This could suggest that relative humidity is not a limiting factor for growth, as evaluated in this study, but for the metabolism of micro-organisms (e.g., synthesis of mycotoxins, antibiotics, volatile compounds, etc.).

In all conditions tested with temperature other than 25°C, results showed a reduction in the growth of *Fusarium graminearum*. And this reduction in growth is accompanied by a synthesis of mycotoxins that is also affected (decreased or increased) by the different conditions. As with growth, the impact of abiotic conditions variation on the specific mycotoxin production of *F.*

graminearum has been studied. The influence of temperature and humidity on mycotoxin production by *Fusarium* fungi is probably not entirely direct but rather a function of the influence of these parameters on fungal growth. Harvell et al (2002) (33) put forward three hypotheses on how pathogens will be influenced by climate change. They suggested that increased temperatures could increase pathogen development, transmission, and number of generations, increase winter survival, and reduce growth restrictions during this period and alter host susceptibility. It has been observed in this study that at 25°C and 80% RH the production of DON increases significantly compared to 25°C and 60% RH, showing that there is an effect of RH variation on mycotoxinogenesis as opposed to growth. It has also been seeing that temperatures except 25°C (20°C, 30°C and 33°C) stimulate ZEN production and inhibit DON production. These results are in agreement with several studies (27,28,34–36), which validates the experimental approach. The objective was to identify how suboptimal abiotic conditions could impact the distribution of the species and mycotoxin contamination in different geographical aera but also with the variation of factors in these aera. *Fusarium graminearum* can synthesize DON and ZEN in different amounts depending on the conditions under which it operates. Several studies state that the main elements of climate change, such as high temperatures and increasing carbon dioxide levels, are impacting the biology, ecology and behaviour of wheat pathogens (37). *Fusarium spp*. (DON, FBs, T2, HT-2, and ZEN) adapt to a wide range of habitats and have a global distribution (34). Schmidt-Heydt et *al* (2010) (36) revealed the dramatic effect that changes in a_w, temperature had on the growth and DON produced by *F. culmorum* and *F. graminearum* for the first time. Overall, their results indicated that growth of both species only occurred at upper 0.90 a_w although DON production by both species was lower at 15°C than at 25°C confirming the results of this study.

Relative humidity impacts mycotoxin production but could also impact the spatial distribution of DON-producing species. This hypothesis is confirmed by several authors who state that despite the key role of agricultural practices in the prevalence of *Fusarium* pathogens, the predominance of *F. graminearum* or *F. culmorum* is determined, to a greater extent, by climatic factors, particularly temperature and humidity (38), and thus can change dramatically in different geographic areas. The occurrence of different mycotoxins in the field may be related to the geographic location of the crop and weather condition.

Warmer temperatures are expected to occur in northern regions, which will expand the area of cereal crops by 2050; disease severity and area under the disease curve are also expected to increase (19). Warmer winter temperatures may also allow wheat pathogens to overwinter in areas where they are currently cold-limited, increasing the amount of primary inoculum and

causing larger and earlier infections in the following growing season (39). DON is a common mycotoxin found in wheat in all countries, with contamination rates ranging from 50% in Asia to 76% in Africa. For ZEN, a wide variation in its incidence around the world has been reported. Perron et *al* (34) have shown a low incidence of ZEN in Asia (15%) and the highest in Africa (59%). In the case of Europe, which is characterized by a wide range of climatic conditions from the south (Mediterranean countries) to the central and northern regions, there have differences in the species composition associated with *Fusarium* head blight (40). The species differ in their climatic distribution and in the optimal climatic conditions they require (20). *F. graminearum* is more common than *F. culmorum* in all cereals in all Nordic countries (41-44).Thus, fusarium head blight (FHB) is expected to promote higher levels of inoculum for subsequent wheat crops in warmer northern latitudes due to the introduction of forage maize in the crop rotation (45). In the case of Africa, warmer tropical climates and periods of drought stress would have a significant impact on the amount of food produced and would also be more prone to mycotoxin contamination. This will have a direct impact on food safety and nutritional quality, which could be compromised. Miraglia et al (2009) (46) suggested that in the area of food safety, the impact of climate change on mycotoxins should be considered on a case-by-case basis due to the different optimal and marginal conditions for growth and toxin production. There are other examples where pathogen ranges have been shown to change in response to climatic variables such as *Puccinia striiformis f.sp. tritici* in response to rainfall patterns in South Africa (47).

A reduction of the mycotoxin concentration was observed during the *in vitro* confrontations. This reduction could be due to 3 possible scenarios: either they are degraded by the BCAs into degradation by-products, or they are no longer synthesized (molecules produced by the BCAs which deactivate their biosynthetic pathways) or they are directly fixed by the mycelium of the BCAs and are therefore no longer present in the culture medium. The impact of abiotic factors on the efficiency of BCAs to control growth and mycotoxin production of *F. graminearum* was studied. At 25°C all RH, BCAs significantly reduced specific DON production even at 80% RH where production was higher. At 30°C, it was found that the variation in RH affected the efficiency of the BCAs. At 30°C/60% & 80% RH only Polyversum® and Mycostop® were effective even though the amount of DON produced was low. In contrast to DON, ZEN production increases with the most stressful conditions (low or high temperature: 20°C/30°C, low RH: 40%). At 25°C, only Polyversum® significantly controls ZEN production except at 25°C/80% where Xedavir® is effective. At 30°C, all BCAs significantly controlled ZEN

production but Polyversum® was more effective. Depending on the conditions, Mycostop® and Xedavir® have contrasting levels of efficacy. For example, at 25°C/40% and 30°C/60%, where similar ZEN production is observed when the pathogen is alone, Xedavir® and Mycostop® are more effective at 30°C/60%. These results show that variations in abiotic factors can drastically impact the efficacy of BCAs and could affect their different mechanisms of action. Mycostop® growth was low in all conditions. It had a minimal effect on pathogen growth. As regards to mycotoxin production, Mycostop® was found to reduce it, suggesting the production of antifungal compounds capable to block DON and ZEN production. Polyversum® was also the only BCA that exhibited a greater capacity to reduce the growth and toxins of *F. graminearum* under all abiotic conditions tested. Polyversum® was inoculated with plugs contrary to Mycostop® and Xedavir® which have been inoculated with spore suspension. This could explain it be part of the difference of activity because it was already active. It is likely also from the result that the oomycete *Pythium oligandrum* (Polyversum®) used several mechanisms at once to counteract the pathogen. Pellan et al (2020, 2021) (22,48) showed that Polyversum® stimulates the germination of *F. graminearum* spores. A study by Vallance et *al* (2009) (49) on the influence of *Pythium oligandrum* on the population dynamics of fungi and oomycetes in the rhizosphere revealed that the BCA is able to produce tryptamine (an auxin-like compound) and oligandrin (a glycoprotein elicitor). These two compounds could be at the origin of the stimulation of pathogen spore germination. This type of mechanism may involve other mechanisms of attack to extract carbon (mycoparasitism) by dissolving the cell wall or membrane of the pathogens through secretion of enzymes such as chitinases, chitosanases or glucanases (50). Pellan et *al*. (2021) (22) revealed also, that Polyversum®, in the presence of *F. graminearum*, immediately exhibited its ability to parasitize. This result agrees with those of Horner, Grenville-Briggs, and van West (2012) (51) which state that the oomycete *Pythium oligandrum* is a mycoparasitic BCA capable of opposing several plant pathogens. In the same study, it was demonstrated the presence of transcripts coding for glucanases, proteases, effectors, and presumed elicitors, which may play a role in mycoparasitism. These different mechanisms could explain the efficacy of this BCA under all conditions. For Mycostop® and Xedavir®, the results show that their behaviour depends on environmental conditions but also on the behaviour of the pathogen. When there is a high production of DON (25°C), the BCAs are more effective in controlling DON at the expense of controlling ZEN. The same scenario is observed when there is a high production of ZEN (30°C). This may be due to the impact of varying abiotic factors on the different mechanisms of action of these two BCAs.

Conclusion(s)

The rational management of cereal pathogens is an integral and ongoing activity in agriculture. The interactive effects of variations in abiotic factors with other biotic variables need further analysis. This study aimed to identify the optimal temperature and relative humidity conditions for the efficiency of BCAs against *F. graminearum*, that would help growers to select one of them and the interest to use them regarding the weather observed in their fields at stages of the plant and fungal life cycle that are critical for the infection and production of mycotoxins. It therefore concluded that the effect of abiotic factors, temperature, and relative humidity, on *F. graminearum* and BCAs could be complex. Growths are impacted differently between pathogen and BCAs. But BCAs always manage to limit the growth of the pathogen whatever the varying conditions that could be encountered in the field. For mycotoxin production, there was a differential effect on DON and ZEN production depending on the conditions. The effectiveness of BCAs in controlling this production varied with the mycotoxin produced and the growing conditions. This indicates that there is a difference in adaptation or adaptation mechanisms to abiotic factors between microorganisms. Thus, it is complex to obtain a clear picture of the influence of abiotic conditions on overall mycotoxin contamination of crops, the ecology and adaptation of toxigenic fungi, and the efficacy of BCAs use. To date, there are no studies on the influence of abiotic factors on the behavior of these three BCAs towards *F. graminearum*. This is the first *in vitro* study on the effect of relative humidity and temperature on the growth and production of DON and ZEN by *Fusarium graminearum* but also on the three commercial BCAs. Previous studies have been conducted on other parameters such as water activity and other potential BCAs. The actual impacts of abiotic factors will therefore still be difficult to determine and will require more extensive data and experiments, both *in vitro* for ecological aspects extended to multi-strain analyses, and *in vivo* (*in spicula* and *in planta*) with experimental trials associated with predictive models tentatively established from *in vitro* data that need to be effectively validated by field data. In fact, a better understanding and prediction relies on modelling the impact of temperature and relative humidity variation on microorganisms with experimental data from this work. It is also necessary to identify the different mechanisms that are involved in the reduction of pathogen growth and mycotoxins by BCAs in the change of abiotic factors.

References.

1. IPCC [Online]. [cited 2022 Sep 4]. Available from: https://www.ipcc.ch/2015/

2. Buckley TR, Marske K, Attanayake D. Phylogeography and ecological niche modelling of the New Zealand stick insect *Clitarchus hookeri* (White) support survival in multiple coastal refugia. Journal of Biogeography **37(4)**:682–95 (2010).

3. Huey RB, Kingsolver JG. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. Trends Ecol Evol. 1989 **4(5)**:131–5 (1989).

4. Kearney M. Habitat, environment, and niche: what are we modelling? Oikos **115(1)**:186–91 (2006).

5. Schulte PM, Healy TM, Fangue NA. Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. Integr Comp Biol **51(5)**: 691–702 (2011).

6. Angilletta MJ. Adaptation to Anthropogenic Climate Change. In: Angilletta Jr. MJ, editor. Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis [Online]. Oxford University Press; 2009 [cited 2022 Sep 4]. p. 0. Available from: https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570875.003.0009

7. Chown SL, Terblanche JS. Physiological Diversity in Insects: Ecological and Evolutionary Contexts. In: Simpson SJ, editor. Advances in Insect Physiology **33**: 50–152 (2006).

8. Clusella-Trullas S, Blackburn TM, Chown SL, Rio AECM del, McPeek EMA. Climatic Predictors of Temperature Performance Curve Parameters in Ectotherms Imply Complex Responses to Climate Change. The American Naturalist **177(6)**: 738–51 (2011).

9. Gregory RD, Willis SG, Jiguet F, Voříšek P, Klvaňová A, Strien A van, et al. An Indicator of the Impact of Climatic Change on European Bird Populations. PLOS ONE **4(3)**: e4678 (2009.

10. Fitt BDL, Fraaije BA, Chandramohan P, Shaw MW. Impacts of changing air composition on severity of arable crop disease epidemics. Plant Pathology **60(1)**: 44–53 (2011).

11. Bebber DP. Range-expanding pests and pathogens in a warming world. Annu Rev Phytopathol **53(1)**: 335–56 (2015).

12. Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins 1**1(7)**: 375 (2019).

13. Legrand F, Picot A, Cobo-Díaz JF, Chen W, Le Floch G. Challenges facing the biological control strategies for the management of Fusarium Head Blight of cereals caused by *F. graminearum*. Biological Control **113**: 26–38 (2017).

14. Kabak B, Dobson ADW. Biological Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins. Journal of Food Protection **72(9)**: 2006–16 (2009).

15. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. IJERPH **14(6)**: 632 (2017).

16. Gardiner DM, Kazan K, Manners JM. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology **46(8)**: 604–13 (2009).

17. Xu X, Qin G, Tian S. Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. International Journal of Food Microbiology **126(1)**: 153–8 (2008).

18. Bertero A, Moretti A, Spicer LJ, Caloni F. Fusarium Molds and Mycotoxins: Potential Species-Specific Effects. Toxins **10(6)**: 244 (2018).

19. Ghini R, Hamada E, Bettiol W. Climate change and plant diseases. Sci agric (Piracicaba, Braz) **65**: 98–107 (2008).

20. Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, et al. Within-field variability of Fusarium head blight pathogens and their associated mycotoxins. European Journal of Plant Pathology **120(1)**: 21–34 (2008).

21. Nazari L, Pattori E, Manstretta V, Terzi V, Morcia C, Somma S, et al. Effect of temperature on growth, wheat head infection, and nivalenol production by *Fusarium poae*. Food Microbiology **76**: 83–90 (2018).

22. Pellan L, Dieye CAT, Durand N, Fontana A, Strub C, Schorr-Galindo S. Biocontrol Agents: Toolbox for the Screening of Weapons against Mycotoxigenic Fusarium. Journal of Fungi. **7(6)**: 446 (2021).

23. Moreau S, Levi M. Highly sensitive and rapid simultaneous method for 45 mycotoxins in baby food samples by HPLC-MS/MS using fast polarity switching (POCON1480E). Am Soc Mass Spectrom First Edition June. 2014;1(7).

24. Saremi H, Burgess LW, Backhouse D. Temperature effects on the relative abundance of Fusarium species in a model plant–soil ecosystem. Soil Biology and Biochemistry **31(7)**: 941–7 (1999).

25. Blanquart, François, et al. A practical guide to measuring local adaptation. Ecology letters **16(9)**: 1195-1205 (2013).

26. Kawecki, Tadeusz J., and Dieter Ebert. Conceptual issues in local adaptation. Ecology letters **7(12)**: 1225-1241 (2004).

27. Moretti A, Pascale M, Logrieco AF. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. Trends in Food Science & Technology **84**: 38–40 (2019).

28. Peter Mshelia L, Selamat J, Iskandar Putra Samsudin N, Rafii MY, Abdul Mutalib NA, Nordin 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 **12(8)**: 478 (2020).

29. Manstretta V, Rossi V. Effects of temperature and moisture on development of *Fusarium graminearum* perithecia in maize stalk residues. Applied and environmental microbiology **82(1)**: 184–91 (2016).

30. Lahouar A, Marin S, Crespo-Sempere A, Saïd S, Sanchis V. Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. International journal of food microbiology **242**: 53–60 (2017).

31. Moretti A, Pascale M, Logrieco AF. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. Trends in food science & technology **84**: 38–40 (2019).

32. Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. Influence of Climatic Factors on Fusarium Species Pathogenic to Cereals. European Journal of Plant Pathology **109(7)**: 755–68 (2003).

33. Harvell, C. Drew, et al. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science **296(5576)**: 2158-2162 (2002).

34. Perrone G, Ferrara M, Medina A, Pascale M, Magan N. Toxigenic Fungi and Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction and Prevention of the Risk. Microorganisms **8(10)**: 1496 (2020).

35. Paterson RRM, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? Food research international **43(7)**: 1902–14 (2010).

36. Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two Fusarium species. Journal of the Royal Society Interface **8(54)**: 117–26 (2011).

37. Desjardins, Anne E. *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press), 2006.

38. Xu, X-M., et al. Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. Phytopathology **98(1)**: 69-78 (2008).

39. Madgwick, James W., et al. Impacts of climate change on wheat anthesis and fusarium ear blight in the UK. European Journal of Plant Pathology **130(1)**: 117-131 (2011).

40. Logrieco, Antonio F., and Antonio Moretti. Between emerging and historical problems: An overview of the main toxigenic fungi and mycotoxin concerns in Europe. Mycotoxins: detection methods, management, public health, and agricultural trade, pp. 139-154 (2008).

41. Yli-Mattila T, Hussien T, Abbas A. Comparison of biomass and deoxynivalenol production of northern European and southern European *Fusarium graminearum* isolates in the infection of wheat and oat grains. J Plant Pathol **104(4)**: 1465–74 (2022).

42. Yli-Mattila T, Rämö S, Hietaniemi V, Hussien T, Carlobos-Lopez AL, Cumagun CJR. Molecular Quantification and Genetic Diversity of Toxigenic Fusarium Species in Northern Europe as Compared to Those in Southern Europe. Microorganisms **1(1)**: 162–74 (2013).

43. Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Jestoi M, Parikka P, Hietaniemi V, Gagkaeva T, et al. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. Archives of Phytopathology and Plant Protection **41(4)**: 243–60 (2008).

44. Parikka P, Kaukoranta T, Hietaniemi V, Rämö S, Sarlin T, Laitila A. Trends in Fusarium species composition of Finnish cereal grain in 2007-2017. Nordic Baltic Fusarium Seminar; 2019 4.4; Denmark. Available from: http://pbl.fi/en/pbl_publications.htm

45. Maiorano A, Blandino M, Reyneri A, Vanara F. Effects of maize residues on the Fusarium spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. Crop Protection **27(2)**: 182–8 (2008).

46. Miraglia M, Marvin HJP, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, et al. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. Food and Chemical Toxicology **47(5)**: 1009–21 (2009).

47. Boshoff WHP, Pretorius ZA, van Niekerk BD. Establishment, Distribution, and Pathogenicity of *Puccinia striiformis f. sp. tritici* in South Africa. Plant Disease **86(5)**: 485–92 (2002).

48. Pellan L, Durand N, Martinez V, Fontana A, Schorr-Galindo S, Strub C. Commercial Biocontrol Agents Reveal Contrasting Comportments Against Two Mycotoxigenic Fungi in Cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. Toxins **12(3)**: 152 (2020).

49. Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, et al. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of Pythium oligandrum. Environ Sci Pollut Res **21(7)**: 4847–60 (2014).

50. Junaid JM, Dar NA, Bhat TA, Bhat AH, Bhat A. Commercial Biocontrol Agents, and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. Anim Sci **19** (2013).

51. Horner NR, Grenville-Briggs LJ, van West P. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. Fungal Biology **116(1)**: 24–41 (2012).

Chapitre I

Partie 2

Evaluation *in spicula* et *in planta* des effets antifongiques d'agents de biocontrôle (BCAs) contre *Fusarium graminearum* sous différentes conditions d'humidité relative

Evaluation *in spicula* et *in planta* des effets antifongiques d'agents de biocontrôle (BCAs) contre *Fusarium graminearum* sous différentes conditions d'humidité relative

Cette partie vient en complément de la première partie du Chapitre I qui portait sur l'étude des effets des facteurs abiotiques sur la croissance des BCAs et de *Fusarium graminearum*, sur la mycotoxinogénèse et sur leurs interactions.

Le choix de l'humidité relative (HR) est basé sur les résultats préliminaires qui ont montré que ce facteur abiotique impactait positivement la production de mycotoxines du pathogène notamment le DON. Il y avait une différence significative de productions spécifiques de DON et de ZEN entre 60% et 80% de HR à 25°C. La capacité des BCAs à contrôler la production de mycotoxines était aussi impactée. Il paraissait important d'évaluer la capacité des BCAs à contrôler le pathogène et ses mycotoxines dans des conditions plus proches de la réalité du pathosystème. Pour se rapprocher au plus près des conditions réelles de terrain, il a été choisi d'évaluer directement sur épillets de blé détachés (*in spicula*) et sur la plante les effets de l'application des BCAs sur le développement du pathogène et sa production de mycotoxines.

Dans un premier temps, des confrontations entre BCAs et *Fg* ont été mises en place sur des épillets détachés placés dans des tubes à essai contenant un milieu agar/eau (3 $g.L^{-1}$) sous deux HR différentes (60% et 80%) à 25°C. Dans un second temps, les confrontations ont été conduites sur la plante entière à 25°C et 80% HR.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Confrontations *in spicula* entre BCAs et *F. graminearum* à 60 et 80% HR

Les confrontations entre *F. graminearum* et les trois BCAs ont été réalisés sur des épillets de blé détachés. Le blé dur *Triticum durum*, cultivar Miradoux® (Florimond Desprez®) a été d'abord cultivé à partir de semences non traitées en chambre de culture dont les paramètres suivants ont été contrôlés : 20°C de température avec une photopériode de 16 h jour et 8 h nuit avec une lampe à sodium de 400 W (Phillips, Amsterdam, Pays-Bas) jusqu'au stade de début de la floraison. Les épis ont été récoltés et les épillets ont été détachés et utilisés immédiatement pour les confrontations.

Les épillets détachés ont été plongés dans une suspension de spores de BCAs (Mycostop et Xedavir) à 10^5 spores. mL^{-1} ou dans de l'eau servant de contrôle (water : w), pour Polyversum les épillets ont été directement mis en contact avec du mycélium du BCA. Les épillets ont été ensuite placés dans des tubes à essai contenant un milieu eau-agar (3 $g.L^{-1}$) avec le rachis inséré dans le milieu gélosé pour leur bonne conservation. Après quatre jours, les épillets imprégnés

de BCAs ont été rapidement retirés des tubes et trempés dans une suspension de spores de *F. graminearum* à une concentration de 10^4 spores. mL^{-1} ou dans de l'eau en guise de contrôle. Ils ont ensuite été repositionnés dans le milieu gélosé dans les tubes. Les tubes ont été incubés à 25°C avec 60% et 80% HR dans des enceintes bioclimatiques (ICH750 C, Memmert, Schwabach, Allemagne). Une évaluation visuelle de la colonisation externe de *F. graminearum* a été réalisée aux jours 7 et 14 après infection par *F. graminearum* pour chaque épillet, en utilisant une échelle visuelle proposée par Comby et al. (2017) et modifiée par Pellan et al. (2021). Le niveau 0 a été attribué au symptôme de la maladie, niveau 1 à la dégénérescence du tissu de l'épillet, niveau 2 au début de l'apparition de la nécrose, niveau 3 au mycélium visible sur tous les tissus de l'épillet, niveau 4 au mycélium et à la nécrose et niveau 5 aux épillets fortement infectés par le mycélium, la nécrose et la présence possible de sporodochies.
Pour chaque modalité et chaque jour d'échantillonnage, 15 épillets ont été considérés. Les échantillons infectés avec le pathogène ou avec de l'eau ont été disséqués et les tissus internes ont été examinés à l'aide d'un microscope optique Zeiss PrimoStar avec une caméra Zeiss Axiocam ERc5s (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, Etats-Unis) pour vérifier la présence de conidies du pathogène à l'intérieur des tissus de l'épillet.

1.2. Confrontations entre BCAs et *F. graminearum* sur la plante de blé

Les confrontations entre *F. graminearum* et les trois BCAs ont été réalisés sur des plantes de blé. Le même cultivar de blé dur a été utilisé dans les mêmes conditions de culture jusqu'au stade de floraison. Les plantes ont ensuite été déplacées dans les chambres bioclimatiques pour contrôler la température et l'HR d'incubation des confrontations (25°C/60%HR). Deux modes d'infection, adaptés de Changenet et al. (2021) et Gatti et al. (2019), ont été testés pour sélectionner la meilleure méthode. Le premier mode consistait en un dépôt de 10 µl de suspension de spores à 10^6 spores. mL^{-1} pour les BCAs (Mycostop et Xedavir) et le pathogène, entre le $3^{ème}$ et le $4^{ème}$ épillet de l'épi en partant du haut. Pour Polyversum, des fragments de mycélium ont été déposés au même endroit. Le second mode consistait à utiliser des pulvérisateurs contenant 5 ml de chaque suspension de spores à la même concentration et repartir leur contenant sur 20 épis. Les BCAs ont été appliqués en premier sur les épis des plantes 4 jours avant l'application du pathogène. Aux jours 7 et 14, un pourcentage d'infection est calculé pour chaque traitement en considérant 20 épis. Le pourcentage d'infection est le ratio du nombre d'épillets infectés sur le nombre total d'épillets pour chaque épi multiplié par cent (formule ci-dessous).

Infection rate (%) = $\frac{number\ of\ infected\ spikelets\ per\ spike}{total\ number\ of\ spikelets\ per\ spike} \times 100$

1.3. Extraction et quantification des mycotoxines

Pour les confrontations *in spicula*, neuf épillets de chaque traitement ont été broyés séparément avec de l'azote liquide et 5 mL d'un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (79:20:1, v/v/v) ont été ajoutés. Les échantillons ont été homogénéisés par agitation orbitale à 250 RPM pendant 20 minutes. Ensuite ils ont été dilués au 1/2 dans de l'eau/acide acétique (99,5:0,5 ; phase mobile de l'analyseur) et filtrés avec un filtre CA (0,45 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne) avant d'être injectés. La détection et la quantification des mycotoxines ont été réalisées à l'aide d'une chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC, Shimadzu, Tokyo, Japon) couplée à un spectromètre de masse (8040, Shimadzu, Tokyo, Japon) comme décrit dans la première partie du chapitres 1.

Pour les confrontations *in planta*, chaque épi a été subdivisé en trois parties (les épillets qui sont en tête de l'épi : t ; au milieu : m et en bas : b). Pour chaque traitement, 15 épis ont été broyés et le même protocole utilisé pour les épillets a été reconduit. Ensuite 5 grains de blé de chaque épi, pour chaque traitement, ont été récoltés aléatoirement et broyés pour extraire les mycotoxines avec le même protocole.

1.4. Quantification de *F. graminearum* par qPCR

Pour les confrontations sur épillets, trois épillets de chaque traitement ont été collectés 14 jours après l'infection. Sur la plante, 3 épillets de chaque subdivision (t, m et b) de chaque traitement ont été collectés 14 jours après infection. Les échantillons ont été ensuite broyés à l'aide de d'un robot GenoGrinder (SpexSamplePrep, NJ, USA) avec des billes de broyage en acier. L'ADN total a été extrait à partir d'un échantillon de 100 mg de broyat à l'aide du kit d'extraction d'ADN NucloSpin (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. Des amorces nucléotidiques ciblant le gène *Tri5* de la voie de biosynthèse des trichothécènes de *F. graminearum* ont été utilisées pour quantifier le nombre de copies du pathogène GATCTGATGACTACCCTCAATTCCTT et GCCATAGAGAAGCCCCAACAC, amorces « Forward » et «Reverse », respectivement) (Marín et al., 2010). La qPCR a été préparée dans une microplaque de 384 puits à l'aide d'un robot de pipetage avec un volume total de 1,5 µL contenant un volume final de 1 µl de SYBR GREEN PCR master mix (Applied Biosystems, Scoresby, Vic., Australia) et 0,5 µl d'ADN (échantillon) et une concentration finale de 600 nM des amorces (F et R). Les paramètres décrits par Pellan et al. (2021) ont été utilisés pour la

qPCR. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel LightCycler® 480, version 4.0.

2. Résultats et discussion

2.1. Impact des BCAs sur la colonisation externe des épillets par *F. graminearum*

Une notation visuelle a été faite pour comparer l'impact des BCAs sur la colonisation externe des épillets par le pathogène (Figure 1). Dans les deux conditions de HR, aucune différence significative n'a été identifiée sur l'aspect visuel des épillets infectés avec *F. graminearum* seul ou confronté avec les BCAs entre 60% et 80%. C'est pourquoi, il a été choisi de représenter uniquement les courbes de notation visuelle à 80% d'humidité relative. Entre le contrôle et le traitement aux BCAs, deux profils distincts de croissance de *F. graminearum* ont été observés après 14 jours d'infection. *F. graminearum* seul a colonisé tout l'épillet et a produit une grande quantité de mycélium visible et de pigment rouge. Le traitement aux BCAs a provoqué deux niveaux significatifs d'inhibition avec 50% et 25% de réduction de la croissance de *F. graminearum* par rapport au contrôle respectivement par Mycostop et Xedavir. Polyversum a fourni une moindre protection avec une inhibition de 15% au jour 7, perdue au jour 14. Cela montre que *F. graminearum* est parvenu à surpasser la barrière protectrice qui a été constituée par Polyversum au jour 7. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation : le pathogène pourrait sécréter des toxines à l'encontre de Polyversum, notamment le DON connu comme facteur de virulence qui permet au pathogène de mieux coloniser son hôte (Dehghanpour-Farashah *et al.*, 2019; Xian *et al.*, 2022); Polyversum pourrait laisser aussi le pathogène s'installer pour l'hyperparasiter ou biotransformer ses toxines produites par la suite. Mycostop et Xedavir ont conservé leur efficacité observée lors des confrontations in *vitro.*

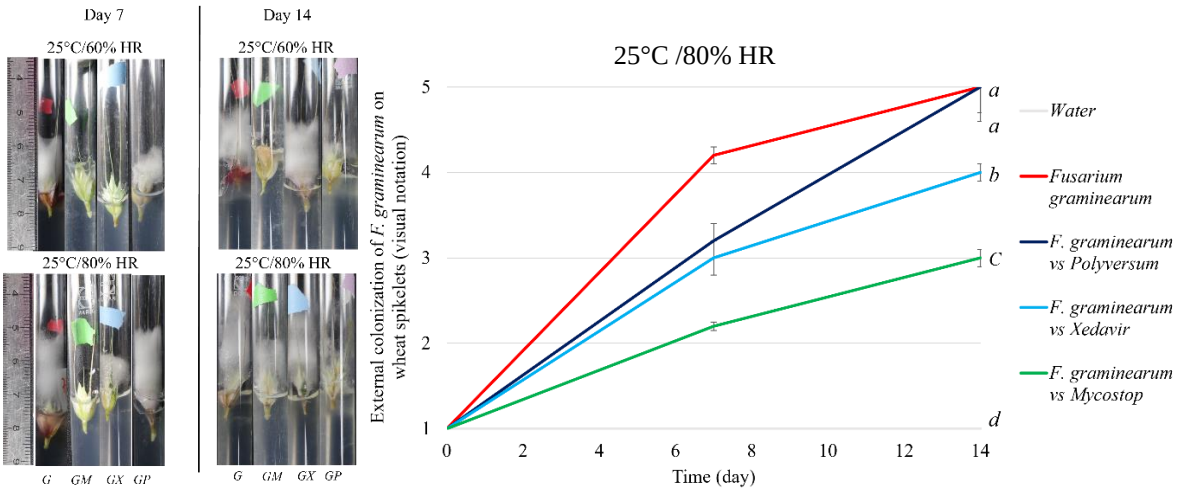


Figure 1 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la colonisation externe des épillets par *F. graminearum.* Les couleurs des courbes (80%) et des photographies correspondent aux différents traitements : G : *F. graminearum ;* GM, GX et GP : *F. graminearum* vs respectivement à M : Mycostop® ; X : Xedavir® ; P : Polyversum® ; Les photos montrent le niveau de contamination après 7 et 14 jours de croissance du pathogène seul ou confronté aux BCAs. Des tests ANOVA ont été effectués suivi de comparaison multiple, p-value < 0,05.

Pour mieux évaluer la colonisation des épillets par *F. graminearum*, une quantification absolue a été réalisée par qPCR au jour 14. Après 14 jours d'infection, la quantité de copies de biomarqueur de *F. graminearum* a été réduite par Mycostop et Xedavir de près de 99% et 90% respectivement dans toutes les conditions (Figure 2). Une différence significative a été aussi observée entre les contrôles (*F. graminearum* seul) à 60% et 80% pouvant signifier que le pathogène serait avantagé par une forte humidité pour son développement. Polyversum n'a pas montré d'effet significatif confirmant les résultats de la colonisation externe. Contrairement aux confrontations *in vitro* où Polyversum se montrait plus efficace que Mycostop et Xedavir toutes conditions confondues, sur les épillets détachés, il est le BCA le moins efficace. Ce résultat pourrait être dû au mode d'inoculation de Polyversum sur les épillets qui est différent de celui des deux autres BCAs. Polyversum pourrait aussi avoir besoin de plus de temps afin de mieux s'installer sur l'épillet pour recouvrer son efficacité (Leonardi *et al.*, 2023; Pisarčik *et al.*, 2022). L'interaction entre *F. graminearum* et Mycostop sur épillet a révélé la capacité du BCA à contrôler le pathogène de façon plus importante que dans les confrontations *in vitro.* Cela pourrait s'expliquer par le fait que la surface de confrontation est plus réduite que lors des confrontations sur boite de Petri (≈1 cm^2). Ainsi, il pourrait y avoir une concentration plus importante des molécules antifongiques sécrétées par ce BCA empêchant alors la progression

du pathogène. Etant donné que Mycostop est préconisé pour des traitements au sol, il serait important d'identifier les molécules antifongiques qu'il produit ainsi que d'évaluer leur toxicité potentielle pour l'Homme et les animaux dans le cas d'une application sur les parties aériennes (épillets). Le nombre de copies d'ADN de *F. graminearum* a aussi fortement baissé quand ce dernier est confronté à Xedavir, par rapport au contrôle, illustrant l'efficacité de ce BCA à contrôler la progression du pathogène sur épillets. Cette efficacité a été observée aussi dans les confrontations *in vitro* dans les mêmes conditions de température et d'humidité. Ces résultats suggèrent aussi que le changement de substrat n'a pas eu d'impact sur l'efficacité de Mycostop et de Xedavir.

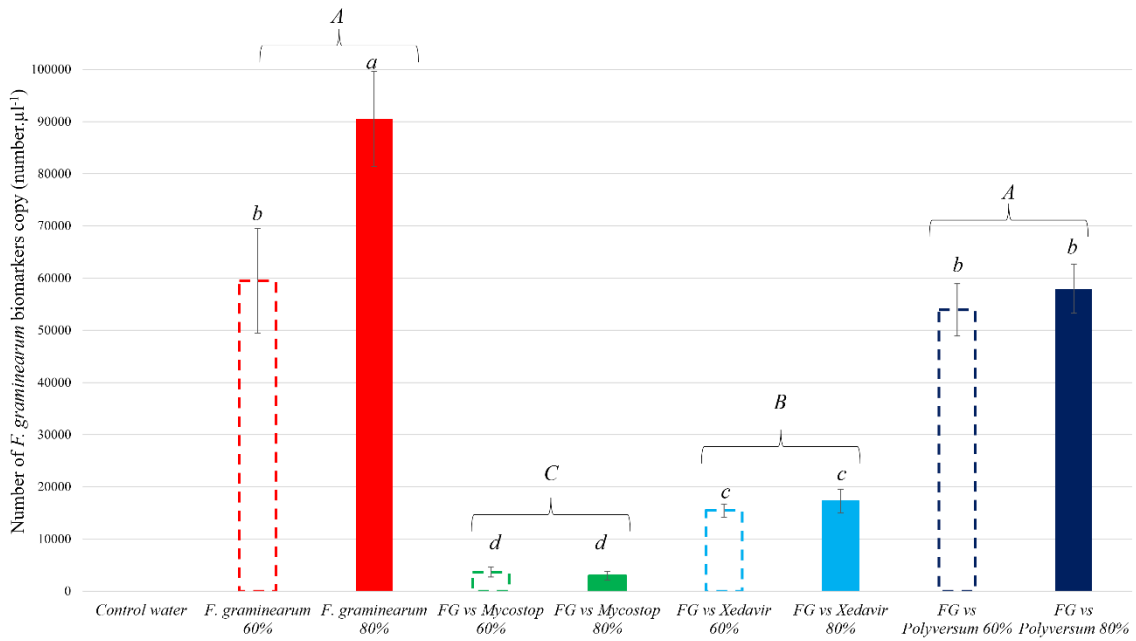


Figure 2 : Quantification comparative de biomarqueur de *F. graminearum* seul et confronté avec des BCAs (Mycostop®, Xedavir® et Polyversum®) sur des épillets détachés à 60% et 80% HR à 25°C. Test ANOVA, valeur $p < 0,05$.

2.2. Impact des BCAs sur la production de mycotoxines par *F. graminearum* sur épillets

Les résultats présentés dans la figure 3 (I et II) mettent en évidence l'impact des BCAs sur la production de DON et de ZEN par *F. graminearum* sur des épillets détachés à 60% et 80% HR. Comparer aux résultats *in vitro* dans les mêmes conditions de température et d'humidité, la production de ZEN est fortement supérieure à celle de DON à 80% HR sur les contrôles. Il y a une différence significative de la production de DON entre 60% et 80% avec une production moitié moindre à 80%. Ce résultat est l'inverse de ce qui a été obtenu *in vitro*, mais une tendance

est respectée sur la proportionnalité de production des deux mycotoxines c'est-à-dire plus une mycotoxine est produite, moins sera l'autre (plus de ZEN que de DON est produite à 60% HR et le contraire est observée à 80% HR). Le DON est un facteur de virulence, il est produit pendant le processus d'infection de la plante pour permettre au champignon de progresser (Huang *et al*., 2020). La ZEN, dont le rôle dans l'infection n'est pas connu, pourrait être produite pendant la phase saprophyte du champignon qui correspond à la fin de cycle de l'infection (Edwards and Jennings, 2018). Cela pourrait expliquer d'une part la différence des teneurs des deux mycotoxines dans les deux conditions : à 60% HR, le pathogène a besoin de produire plus de DON pour coloniser l'épillet, à 80% HR il est plus à l'aise pour se développer sans son facteur de virulence. Une autre hypothèse serait liée à la solubilité des deux mycotoxines par rapport à l'eau. Des études ont montré que l'eau peut modifier la répartition des mycotoxines à l'intérieur du grain de blé en lien avec la solubilité du DON dans l'eau. Lorsqu'il pleut et que le grain absorbe de l'eau en fin de cycle de maturation du grain, le DON solubilisé peut quitter les enveloppes des épillets pour pénétrer dans le grain. Ce qui n'est pas le cas pour la zéaralénone, qui n'est pas soluble dans l'eau (Edwards, 2011; Edwards and Jennings, 2018; Kharbikar *et al*., 2015). Dans le cas de cette étude, les épillets sont plantés dans un milieu agar/eau (3 $g.L^{-1}$), après 14 jours d'infection, le DON pourrait se solubiliser dans le milieu entrainant sa baisse de concentration dans les épillets.

Concernant les traitements aux BCAs, Mycostop et Xedavir ont totalement empêché la production des deux mycotoxines dans toutes les conditions. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vitro* quant à la capacité de ces deux BCAs à contrôler la production de mycotoxine ou sa biotransformation du pathogène. Cette efficacité, comme expliqué dans la première partie du chapitre, pourrait être due à de nombreux mécanismes tels que l'inhibition de la croissance du pathogène (diminution du nombre de copie du pathogène, Figure 2), la biotransformation des mycotoxines produites ou les changements dans l'expression des gènes causés par ces BCAs qui empêcheraient le pathogène de produire ses mycotoxines en inhibant l'expression des gènes des voies de biosynthèse des mycotoxines (Chen et al., 2018; Venkatesh and Keller, 2019). Par ailleurs, Polyversum n'a pas été efficace à 60% HR ou partiellement efficace à 80% HR. Les taux d'inhibition de DON et de ZEN causés par Polyversum *in vitro* sont significativement différents de ceux sur les épillets détachés d'où l'importance de ne pas seulement se limiter aux expérimentations in *vitro* lors du criblage de BCAs. L'utilisation d'épillets détachés avant celle de la plante entière permet de tester une grande quantité de conditions biotiques (traitements BCAs) et abiotiques (différentes HR) à partir d'une petite surface de culture de blé qui peut fournir beaucoup d'épillets (par exemples 10 cm^2 peut donner

plus de 250 épillets), tout en se rapprochant des matrices naturelles sur lesquelles les interactions ont lieu aux champs (la plante). Cette étape peut aider à identifier les BCAs les plus prometteurs avant les tests *in planta*. Ainsi, d'après ces résultats, Mycostop et Xedavir pourraient être les BCAs les plus efficaces contre *F. graminearum* sur la plante.

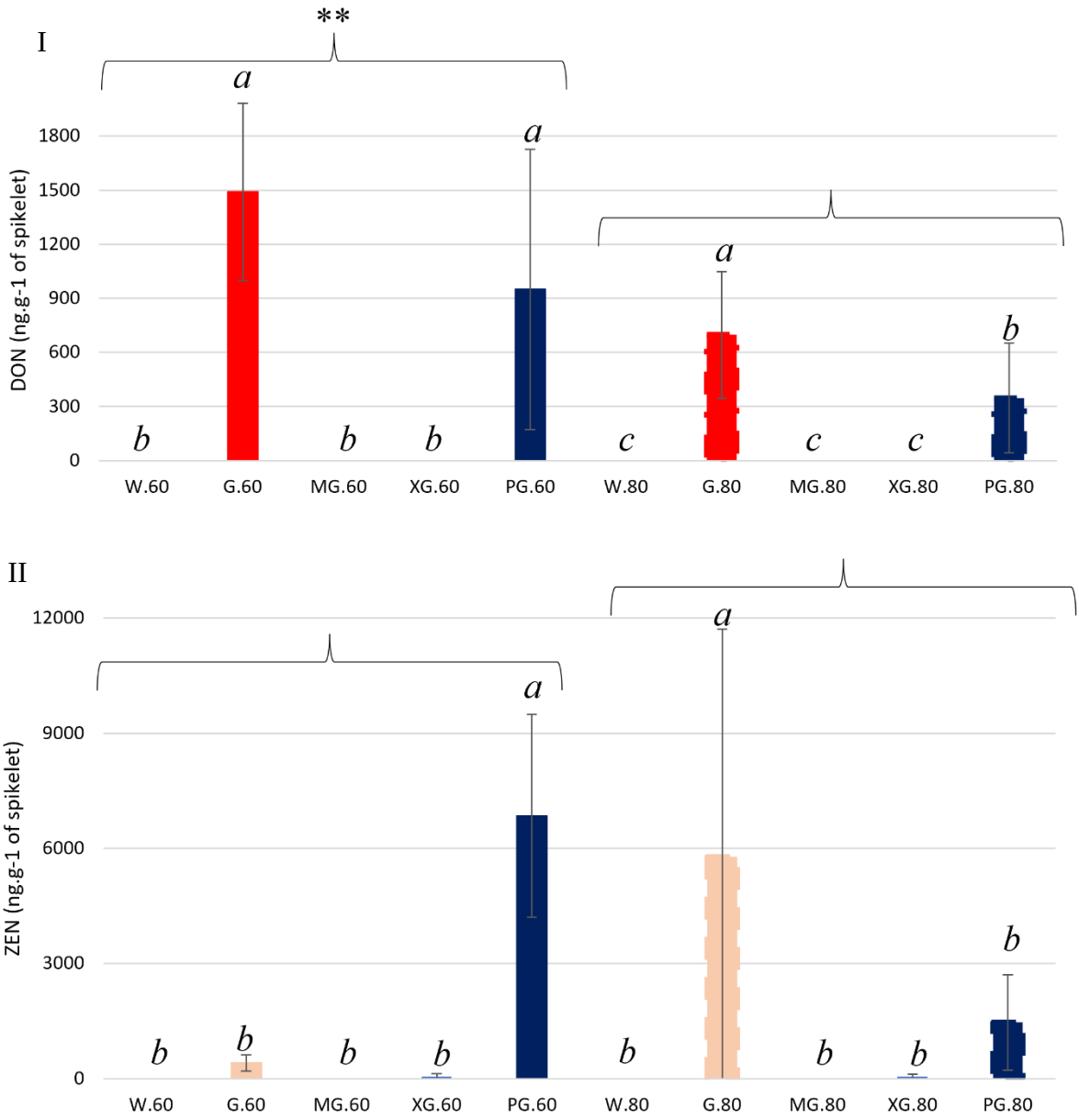


Figure 3 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la production de Deoxynivalenol (DON) et de Zéaralénone (ZEN) par *F. graminearum* lors de confrontations sur des épillets détachés à deux humidités relatives différentes (60 : 60% HR et 80 : 80% HR). W : water (contrôle) ; G : *F. graminearum* seul ; MG, XG et PG : *F. graminearum* vs respectivement à M : Mycostop® ; X : Xedavir® ; P : Polyversum®. La production de DON et de ZEN a été exprimée en $ng.g^{-1}$ d'épillet. Tests ANOVA, p-value < 0.05, suivi de comparaison multiple (a, b, c).

2.3. Impact des BCAs sur le développement de *F. graminearum in planta*

Afin d'identifier le ou les meilleurs BCAs capables de lutter efficacement contre *F. graminearum,* des confrontations sur la plante entière en mimant les conditions favorables à l'infection par le pathogène (25°C/80% HR) ont été réalisées. Les symptômes de l'infection par le pathogène, après 7 et 14 jours d'inoculation, en fonction des différents traitements sont représentés sur la figure 4. Les épis des plantes pulvérisés avec de l'eau (contrôle négatif) sont restés intacts même au-delà de 14 jours. Une comparaison microscopique entre ces épis et ceux traités avec le pathogène seul a été effectuée pour confirmer la présence du pathogène à l'intérieur des épillets (figure 5). Des spores du pathogène ont été trouvées à l'intérieur des épillets 14 jours après l'inoculation confirmant son installation. Une différence notable apparait entre les épis traités avec le pathogène seul et ceux traités avec les BCAs suggérant la capacité des BCAs à contrôler la progression du pathogène sur la plante. Des taux d'infection ont été calculés pour quantifier le niveau d'inhibition des symptômes de la maladie par les BCAs 7 et 14 jours après inoculation (Figure 6). Tous les BCAs ont réduit le nombre d'épillets infectés après 7 et 14 jours : au jour 7, 20%, 30% et 30% d'inhibition par Mycostop, Xedavir et Polyversum, respectivement, par rapport au contrôle (pathogène seul) et au jour 14, 20%, 20% et 35% d'inhibition par Mycostop, Xedavir et Polyversum, respectivement par rapport au contrôle. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vitro* et en partie, ceux sur épillets détachés. Polyversum a recouvré son efficacité à contrôler le pathogène plus efficacement que Mycostop et Xedavir, contrairement à ce qui a été observé sur épillets détachés. Polyversum est préconisé pour traiter les parties aériennes de la plante, il pourrait exister des interactions entre la plante et le BCA qui stimuleraient son efficacité à protéger la plante.

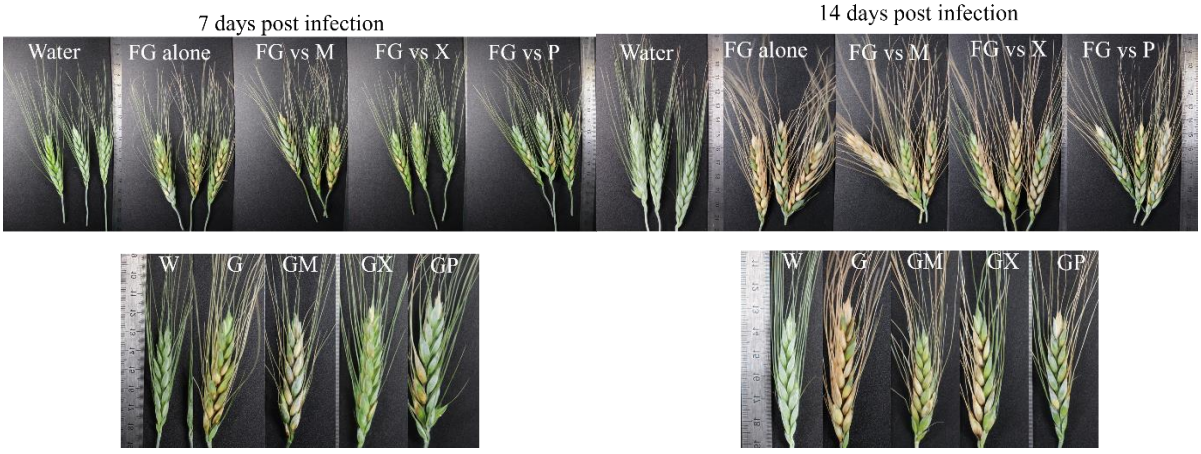


Figure 4 : Symptômes de la fusariose à 7 et 14 jours après l'inoculation par pulvérisation d'épis de plantes entières de blé à 25°C et 80% d'humidité relative. Water (w) : contrôle sans

pathogène ni BCAs, FG *: F. graminearum* seul, FG vs M, X et P : *F. graminearum* vs respectivement à M : Mycostop® ; X : Xedavir® ; P : Polyversum®. Tous les BCAs ont été inoculés 4 jours avant le pathogène.

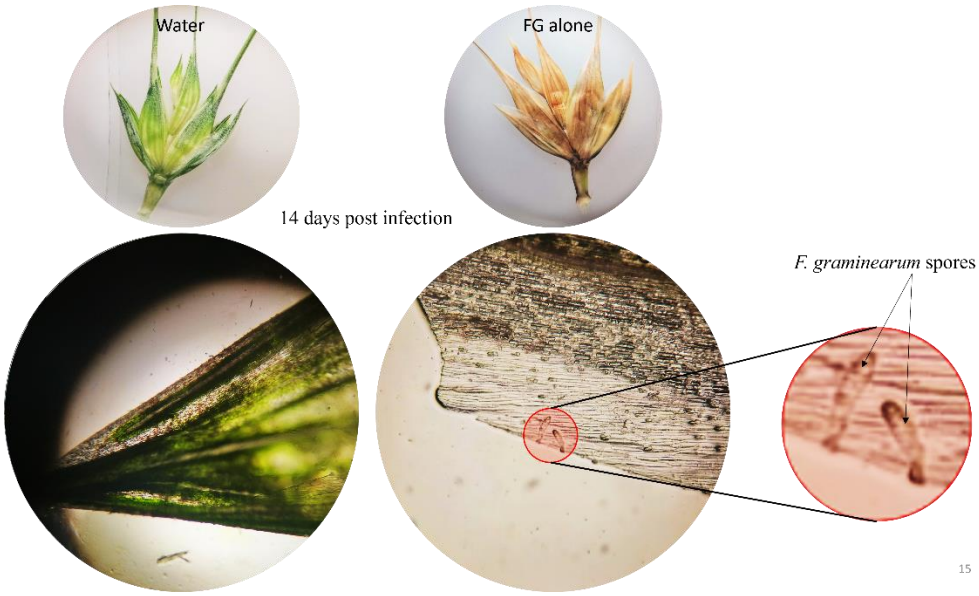


Figure 5 : Observation microscopique comparative (loupe binoculaire en haut, microscope optique en bas) d'épillets traité avec de l'eau ou de *F. graminearum* 14 jours après infection. Le cercle rouge indique la présence de spores à l'intérieur de l'épillet traité avec la pathogène.

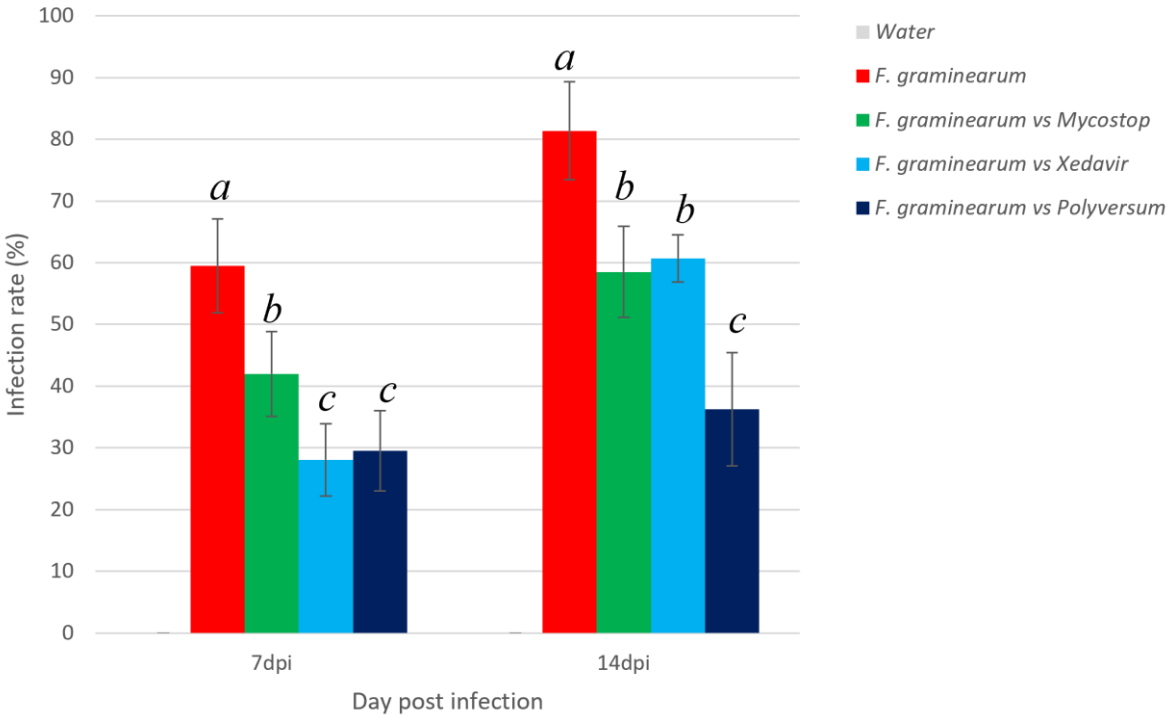


Figure 6 : Pourcentage d'épillets présentant des symptômes de fusariose sur l'ensemble des épis inoculés, 7 jours et 14 jours après l'inoculation par pulvérisation de : Water (w : couleur grise) :

contrôle sans pathogène ni BCAs, FG *: F. graminearum* seul (couleur rouge), FG vs M, X et P : *F. graminearum* vs respectivement à M : Mycostop® ; X : Xedavir® ; P : Polyversum® (verte, bleu clair et bleu foncé). Les données représentent les valeurs moyennes de 20 épis par traitement. Tests ANOVA, p-value < 0,05, suivi de comparaison multiple, les lettres (a, b, c) indiquent les différences significatives entre les traitements et le contrôle.

Afin de comparer les symptômes de la maladie à la présence et la progression du pathogène, une quantification absolue du nombre de copies de *F. graminearum* a été effectuée sur les épillets situés à différents emplacements sur l'épi 14 jours après inoculation (Figure 7). Les épis ont été subdivisés en trois parties, des épillets de chaque partie ont été séparément analysés pour situer les emplacements spécifiques de l'installation du pathogène. Selon les traitements, il y a une différence significative entre les traitements et le contrôle. Sur les BCAs, seul Mycostop a limité significativement la présence du pathogène dans les épillets tous emplacements confondus. Xedavir a partiellement limité le développement du pathogène dans les épillets. Polyversum n'a montré aucune efficacité à contrôler le pathogène à l'intérieur des épillets. Ces résultats sont contradictoires comparer à ceux sur les symptômes de la maladie où tous les BCAs semblaient capables de limiter le développement du pathogène. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le pathogène a la capacité de vivre comme un biotrophe dans les premiers jours de l'infection ne laissant pas apparaitre ou partiellement des symptômes de la maladie (Bönnighausen *et al*., 2019; Brown *et al*., 2017). Cela révèle que l'absence de symptômes de la maladie ne signifierait pas l'absence du pathogène dans les tissus de la plante. Concernant les emplacements sur l'épi, dans tous les traitements, il apparait une légère différence non significative des nombres de copies du pathogène entre les épillets au milieu de l'épi et les épillets des deux autres emplacement (tête et bas). Cela pourrait révéler que la progression du pathogène dans les épis serait centrifuge c'est-à-dire que le pathogène pourrait partir du centre de l'épi vers les extrémités. Pour vérifier cette hypothèse et évaluer la capacité des BCAs à limiter la production des toxines du pathogène, un dosage des mycotoxines a été réalisé en maintenant la même subdivision des épis (Figure 8).

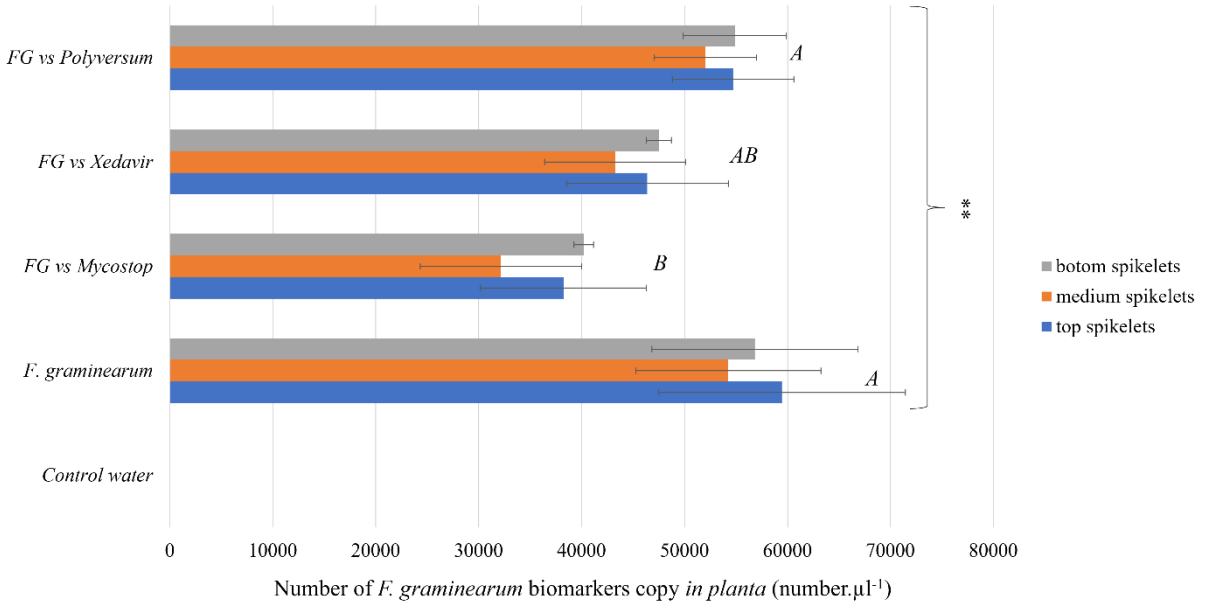


Figure 7 : Quantification comparative de biomarqueur de *F. graminearum* seul et confronté avec des BCAs (Mycostop®, Xedavir® et Polyversum®) sur différentes parties d'épillets issus d'épis de plantes de blé infectés à 25°C et 80% HR, 14 jours après inoculation : couleur grise (épillets en bas des épis), orange (au milieu) et bleu (en tête). Test ANOVA, valeur p < 0,05, suivi de comparaison multiple (A, B).

2.4. Impact des BCAs sur la production de mycotoxines par *F. graminearum in planta*

La capacité des BCAs à limiter les mycotoxines de *F. graminearum* sur plante a été évaluée (Figure 8). Sur la plante, le DON est la seule mycotoxine produite par le pathogène à 7 et 14 après inoculation. Cette mycotoxine est produite lors de la phase biotrophe du pathogène pour progresser dans la plante. Au jour 7, seul Polyversum était parvenu à réduire de moitié le DON par comparaison avec le contrôle et les deux autres BCAs et il n'y a pas de différence significative de la production entre les différents emplacements (Figure 8D). La quantité de DON dans les épillets qui se situaient au milieu des épis était supérieure à celle des épillets de tête et de bas quand le pathogène est seul et quand il est face à Mycostop au jour 7 (Figure 8A et B). Quatorze jours après inoculation, il apparait une diminution de la quantité de DON produite dans les épillets placés au milieu des épis avec une augmentation de celle produite dans les épillets de tête et de bas. Cela semble confirmer l'hypothèse sur la progression du pathogène partant du centre des épis vers les extrémités lors de l'infection de la plante. Au jour 7, le pathogène a produit une quantité importante de DON qui lui a permis de s'installer et se propager progressivement vers les épillets de tête et du bas de l'épi (Huang *et al.*, 2020). Aucun BCAs n'a été efficace pour réduire production de DON sur la plante malgré la limitation des

symptômes de la maladie et du nombre de copies du pathogène par Mycostop dans les épis. Cela pourrait s'expliquer par le fait que d'autres phénomènes non maitrisés sont intervenus dans les interactions pathogène/BCAs et ont conduit à une inefficacité des BCAs.

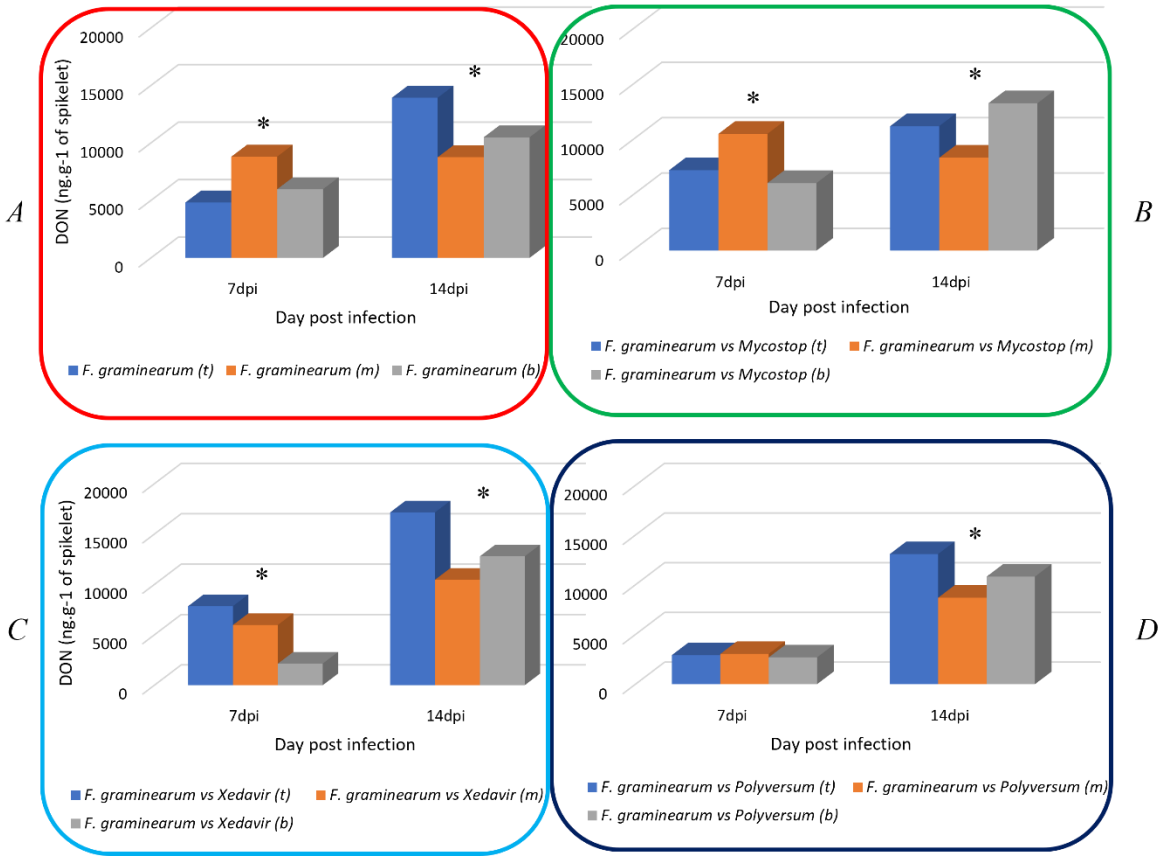


Figure 8 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la production de Deoxynivalenol (DON) par *F. graminearum* lors de confrontations sur plantes de blé à 25°C et 80% HR, 7 et 14 jours après inoculation. Couleur grise des barres (épillets en bas des épis : b), orange (au milieu : m) et bleu (en tête : t). A (encadré rouge) : *F. graminearum* seul ; B (encadré vert), C (encadré bleu clair) et D (encadré bleu foncé) : *F. graminearum* vs respectivement Mycostop®, Xedavir® et Polyversum®. La production de DON a été exprimée en $ng.g^{-1}$ d'épillet. Tests ANOVA, p-value < 0,05.

2.5. Impact des BCAs sur la teneur en mycotoxines des grains de blé

Afin d'évaluer si les BCAs n'ont pas protégé les grains au détriment des enveloppes extérieures, la teneur en mycotoxines dans les grains a été mesurée. La Figure 9 présente à gauche le poids moyen de 50 grains de blé par traitement et à droite un échantillon de 5 grains par traitement qui présente leur état visuel. Il n'y a pas de différence de poids significative entre les grains récoltés sur les épis traités avec de l'eau et ceux traités avec Xedavir. Entre les traitements aux

BCAs, il y a une différence significative par rapport au témoin (pathogène seul) à l'exception de Polyversum qui est comparable au témoin. Si l'on compare ces résultats avec ceux observés sur les symptômes de la maladie, il apparait une différence entre la protection extérieure et intérieure des épis. Les épis traités avec Polyversum avaient moins de symptômes visibles que ceux traités avec Mycostop et Xedavir. Contrairement à la qualité visuelle des grains où Xedavir semble être le BCA le plus protecteur. Des dosages de mycotoxines ont été effectués sur ces grains pour évaluer leur qualité sanitaire et l'impact des BCAs sur cette qualité (Figure 10).

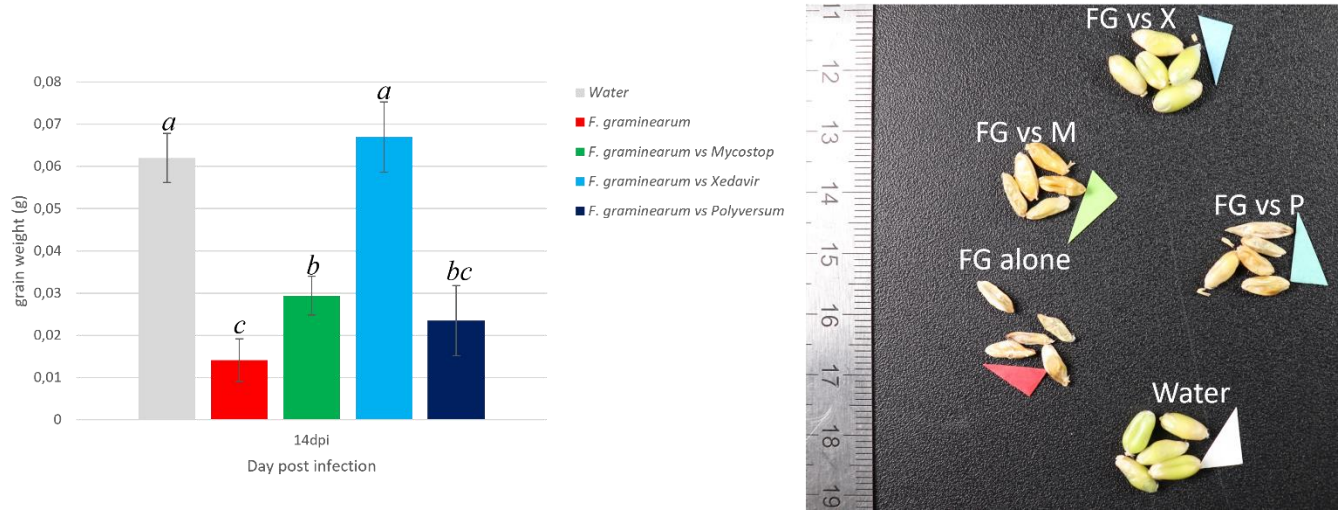


Figure 9 : Evaluation qualitative des grains de blé issus de confrontations sur des épis de plantes entières de blé à 25°C et 80% d'humidité relative. Water (w : couleur grise) : contrôle sans pathogène ni BCAs, FG *: F. graminearum* seul (couleur rouge), FG vs M, X et P : *F. graminearum* vs respectivement à M : Mycostop® ; X : Xedavir® ; P : Polyversum® (verte, bleu clair et bleu foncé). Les données représentent les valeurs moyennes de 50 grains par traitement. Tests ANOVA, p-value < 0,05, suivi de comparaison multiple, les lettres (a, b, c)

Les teneurs en DON et en ZEN dans les grains de blé sont significativement différentes avec une production plus élevée de DON que de ZEN. Mycostop et Xedavir ont fortement inhibé la production des deux mycotoxines (99% et 100% respectivement DON et ZEN). Polyversum a inhibé le DON à 80% mais il a stimulé la production de ZEN avec deux fois plus de ZEN que le contrôle. Ces résultats montrent que les symptômes de la maladie peuvent être visibles sans qu'il ait de dépassement des valeurs seuil de mycotoxines recommandées dans les grains de blé (1750 et 100 µg.kg^{-1} respectivement DON et ZEN) si un traitement efficace est effectué en prévention. Ces résultats suggèrent aussi que le traitement avec Mycostop et Xedavir sur les parties aériennes de la plante pourraient apporter de bons résultats quant à la qualité sanitaire des grains.

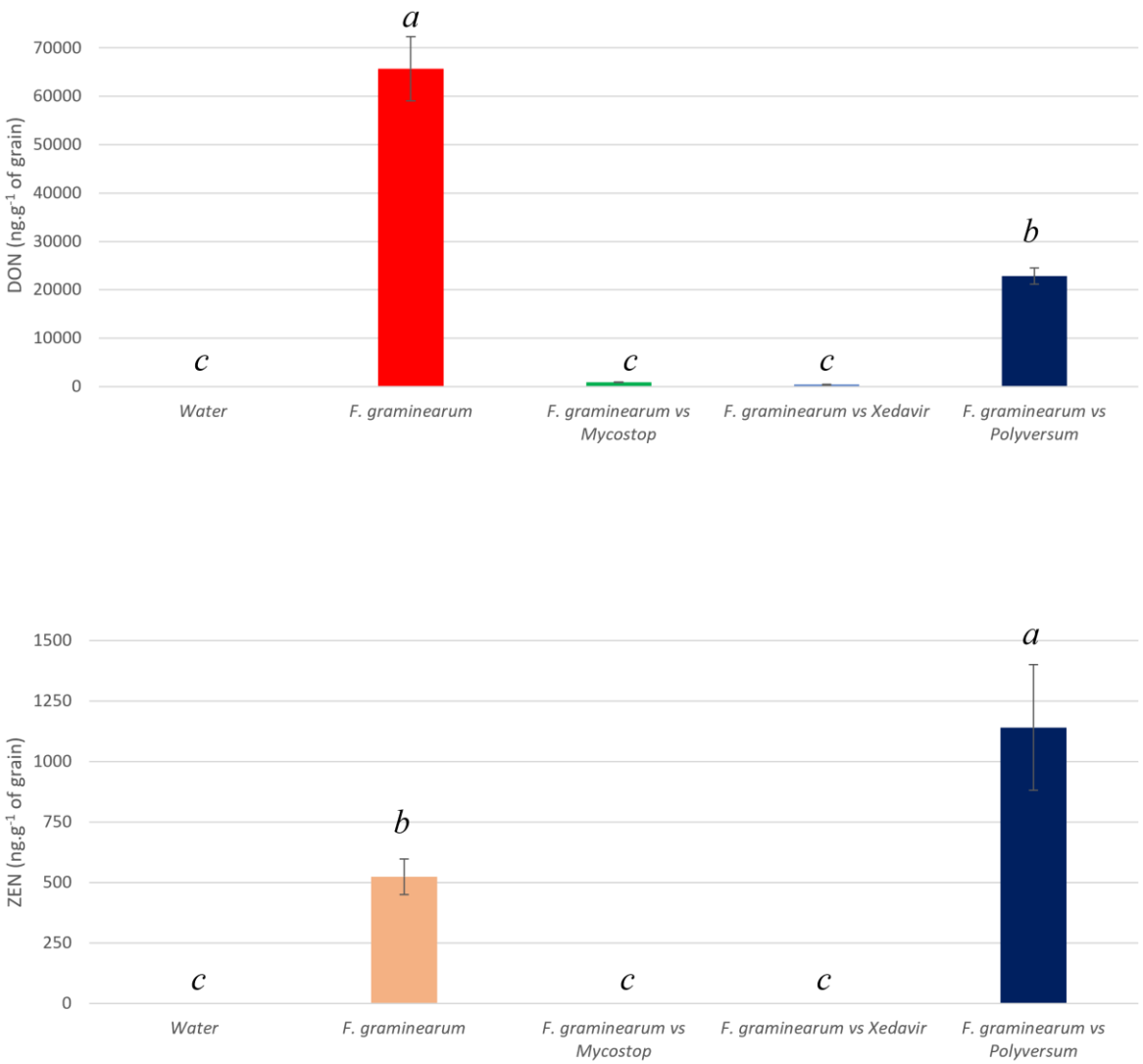


Figure 10 : Effets comparatifs des traitements aux BCAs sur la teneur en mycotoxines produites par *F. graminearum* lors de confrontations sur plantes de blé à 25°C et 80% HR. Water (w : couleur grise) : contrôle sans pathogène ni BCAs, FG *: F. graminearum* seul (couleur rouge pour DON et orange pour ZEN), FG vs M, X et P : *F. graminearum* vs respectivement à M : Mycostop® ; X : Xedavir® ; P : Polyversum® (verte, bleu clair et bleu foncé). Les données représentent les valeurs moyennes de 50 grains par traitement. Tests ANOVA, p-value < 0.05, suivi de comparaison multiple, les lettres (a, b, c).

Conclusion

Les confrontations sur épillets détachés et sur la plante entière ont montré des résultats qui confirment les résultats *in vitro* sur l'efficacité des BCAs dans la lutte contre *F. graminearum.* Toutefois, des contradictions ont pu être observées comme dans le cas de Polyversum qui semblait être le BCA le plus efficace à contrôler la croissance et la production de mycotoxines

du pathogène *in vitro*. Il est le seul BCA, parmi les trois, qui est préconisé pour le traitement des parties aériennes de la plante. Sur épillets détachés et sur plante, il a le moins d'impact négatif sur la production de toxines du pathogène. Cette inefficacité pourrait être due aussi au mode d'inoculation utilisé pour ce BCA, ce qui pourrait lui demander plus de temps pour recouvrer son efficacité. Mycostop et Xedavir étaient moins efficaces que Polyversum dans les tests *in vitro* mais sur épillets et plante, ils inhibent plus la production des toxines du pathogène. Ils jouent aussi un rôle important sur la préservation de la qualité des grains en limitant drastiquement les teneurs en mycotoxines. Xedavir est le seul BCA à préserver l'aspect visuel des grains et leur poids.

En termes de perspectives, il serait intéressant de quantifier le pathogène sur les grains pour voir comment Mycostop et Xedavir parviennent à inhiber totalement les mycotoxines afin de déterminer la cause de cette limitation : est-elle due à une limitation de la présence du pathogène ou est-elle due à une diminution de la production spécifique de mycotoxines par le pathogène ? Des analyses transcriptomiques seraient également intéressantes pour identifier des biomarqueurs qui renseignent sur les modes d'actions des BCAs vis-à-vis du pathogène à des fins d'optimisation. Différentes températures fluctuantes peuvent aussi être testées pour se rapprocher encore plus des conditions de terrain. Il serait aussi intéressant d'étudier les interactions du pathosystème complet en tenant en compte les réactions de défenses de la plante qui semblent impacter les BCAs.

Références

Bönnighausen, J., Schauer, N., Schäfer, W., Bormann, J., 2019. Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum* - decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility. New Phytol 221, 459–469. https://doi.org/10.1111/nph.15377

Brown, N.A., Evans, J., Mead, A., Hammond-Kosack, K.E., 2017. A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection. Mol Plant Pathol 18, 1295–1312. https://doi.org/10.1111/mpp.12564

Changenet, V., Macadré, C., Boutet-Mercey, S., Magne, K., Januario, M., Dalmais, M., Bendahmane, A., Mouille, G., Dufresne, M., 2021. Overexpression of a Cytochrome P450 Monooxygenase Involved in Orobanchol Biosynthesis Increases Susceptibility to Fusarium Head Blight. Frontiers in Plant Science 12.

Chen, Y., Wang, J., Yang, N., Wen, Z., Sun, X., Chai, Y., Ma, Z., 2018. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. Nat Commun 9, 3429. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05683-7

Dehghanpour-Farashah, S., Taheri, P., Falahati-Rastegar, M., 2019. Virulence factors of *Fusarium* spp., causing wheat crown and root rot in Iran. Phytopathologia Mediterranea 58, 115–126.

Edwards, S., 2011. Zearalenone risk in European wheat. World Mycotoxin Journal 4, 433–438. https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1293

Edwards, S.G., Jennings, P., 2018. Impact of agronomic factors on fusarium mycotoxins in harvested wheat. Food Additives & Contaminants: Part A 35, 2443–2454. https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1543954

Gatti, M., Cambon, F., Tassy, C., Macadre, C., Guerard, F., Langin, T., Dufresne, M., 2019. The *Brachypodium distachyon* UGT Bradi5gUGT03300 confers type II fusarium head blight resistance in wheat. Plant Pathology 68, 334–343. https://doi.org/10.1111/ppa.12941

Huang, C., Gangola, M.P., Chibbar, R.N., 2020a. Utilization of wheat spike culture to assess Fusarium head blight disease progression and mycotoxin accumulation. Canadian Journal of Plant Pathology 42, 62–71. https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1621935

Huang, C., Gangola, M.P., Chibbar, R.N., 2020b. Utilization of wheat spike culture to assess Fusarium head blight disease progression and mycotoxin accumulation. Canadian Journal of Plant Pathology 42, 62–71. https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1621935

Kharbikar, L.L., Dickin, E.T., Edwards, S.G., 2015. Impact of post-anthesis rainfall, fungicide and harvesting time on the concentration of deoxynivalenol and zearalenone in wheat. Food Additives & Contaminants: Part A 32, 2075–2085. https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1084652

Leonardi, G.R., Polizzi, G., Vitale, A., Aiello, D., 2023. Efficacy of Biological Control Agents and Resistance Inducer for Control of Mal Secco Disease. Plants 12, 1735. https://doi.org/10.3390/plants12091735

Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2010. Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. Int J Food Microbiol 140, 169–174. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.041

Pellan, L., Dieye, C.A.T., Durand, N., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., Strub, C., 2021. Biocontrol Agents Reduce Progression and Mycotoxin Production of *Fusarium graminearum* in Spikelets and Straws of Wheat. Toxins 13, 597. https://doi.org/10.3390/toxins13090597

Pisarčik, M., Hakl, J., Szabó, O., Nerušil, P., 2022. Efficacy of *Pythium oligandrum* on improvement of lucerne yield, root development and disease score under field conditions. Frontiers in Plant Science 13.

Venkatesh, N., Keller, N.P., 2019. Mycotoxins in Conversation With Bacteria and Fungi. Frontiers in Microbiology 10.

Xian, L., Zhang, Y., Hu, Y., Zhu, S., Wen, Z., Hua, C., Li, L., Sun, Z., Li, T., 2022. Mycotoxin DON Accumulation in Wheat Grains Caused by Fusarium Head Blight Are Significantly Subjected to Inoculation Methods. Toxins (Basel) 14, 409. https://doi.org/10.3390/toxins14060409

Chapitre II

Modelling the effect of temperature and relative humidity on *Fusarium graminearum* and three commercial biological control agents (growth, Deoxynivalenol production and BCAs-pathogen interaction)

Dans ce deuxième chapitre, les données expérimentales décrites dans le chapitre précédent ont été utilisées pour concevoir des modèles mathématiques permettant de contribuer à la prédiction de la croissance des trois BCAs, la croissance et la production de DON de *F. graminearum* en fonction de la température, de l'humidité relative et de la présence ou absence de BCAs. Ces modèles constituent une base de références, à améliorer et enrichir avec d'autres données, et qui permettraient de faire des prédictions en cas de fluctuations de température.

Modelling the effect of temperature and relative humidity on *Fusarium graminearum* and three commercial biological control agents (growth, Deoxynivalenol production and BCAs-pathogen interaction)

Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE[1], Idrissa MBAYE[3], Francis COURTOIS[1], Noël DURAND[1,2], Sabine SCHORR-GALINDO[1], Angélique FONTANA[1], Caroline STRUB[1]
[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France - Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France
[3] Univ Alioune DIOP Bambey (UADB), Bambey, Sénégal
Corresponding author: Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE (cheikhatdieye@gmail.com)

Abstract

The need to manage cereal pathogens will increase as food production continues to intensify to feed a growing human population. Climate is an important driver of microbial population dynamics, so climate change will require adaptive management strategies to address altered plant pathogen behavior. The use of predictive models in predicting fungal growth and mycotoxin production can be applied as a key step in risk management to ensure the safety of food products. The aim of this study was to develop models capable to predict the growth of three commercial biological control agents (BCAs) and the growth and deoxynivalenol (DON) production of *F. graminearum* as a function of temperature (T°) and relative humidity (RH) using two-step modelling approach, including primary and secondary modelling. Results successfully demonstrated that the model of the modified Gompertz equation was able to describe the growth rate of *F. graminearum* and BCAs at different T° and RH. Validation of the polynomial mycotoxin model and the Gompertz final growth model proved their ability to predict specific DON production and growth rates respectively. Growth model performance was greater for F. graminearum, Xedavir and Polyversum than for Mycostop.

Keys Word: climate change; *F. graminearum*; deoxynivalenol; biological control; modelling; abiotic factors

1. Introduction

Food safety has become a very important issue worldwide, and the potential effects of climate change on food crop yields and quality, including on mycotoxin contamination, are now receiving scientific attention, particularly from a risk analysis perspective (Magan et al., 2011). Many cereals pathogens exhibit considerable capacity for generating, recombining, and selecting fit combinations of variants in key pathogenicity, fitness, and aggressiveness traits. Among them, *Fusarium* pathogenic complex causes multi-billion-dollar damages in cereal production worldwide (Bai and Shaner, 2004). Biological control is proposed as a promising environmental solution (Pal and McSpadden Gardener, 2006) and practical option against *Fusarium* pathogens (Vujanovic et al., 2006). However, the efficiency of biocontrol agents depends on environmental conditions (Dieye et al., 2023) as well as on the ability of *Fusarium* taxa to adapt to adverse conditions (temperature variation).

According to some scenarios, climate change will lead to a higher incidence on crop diseases and to a potentially larger use of pesticides at the expense of biocontrol agents (Newton et al., 2011; Raymaekers et al., 2020; Sutherst et al., 2011). Some *Fusarium* species are found to be more abundant in certain environments, climates, or geographic regions. Mycogeographic studies have reported that red *Fusarium* complex (i.e., *F. avenaceum*, *F. culmorum*, and *F. sporotrichioides*) is more frequent in cooler climate regions (Reyneri, 2006; Vujanovic et al., 2006; Yergeau et al., 2006). However, *F. graminearum* is frequently found in warm and dry climates and an optimum temperature between 29°C and 30°C is required for massive macroconidia and perithecia productions (Doohan et al., 2003).

The use of mathematical models to predict the growth of fungi and their mycotoxins is becoming increasingly important in predictive microbiology (Norlia et al., 2020; Yogendrarajah et al., 2015). In this context, the prediction of mycotoxin growth and production in food matrices using the predictive modeling approach can serve as a first step in the reasoned management of fungal disease risks with the aim of assuring the safety of food products. Nevertheless, the ability of *F. graminearum* to produce DON varies according to the strain's genetic diversity, geographical origin, substrate, and environmental conditions, so models based on a single strain may not be representative of *F. graminearum*. Abiotic factors, particularly temperature and humidity, have a significant impact on the development and physiology of *F. graminearum* (Goh et al., 2009). In contrast, fungal growth has less intraspecies variability and the growth boundaries are much similar among *F. graminearum* strains compared to the DON production. To highlight the effect of these parameters on fungal

growth and pathogen mycotoxin production, a two-stage modeling approach can be used. The primary model describes changes in the fungal population over time under specific conditions, while the secondary model explains the effect of environmental factors (e.g., temperature, humidity, aw, pH, etc.) on the microorganism's response (e.g. growth rate, germination rate, lag phase, etc.) (Garcia et al., 2009).

The aim of this study was to develop models capable to predict the growth of three BCAs (*Streptomyces griseoviridis*, *Trichoderma asperellum* and *Pythium oligandrum*) and the growth and DON production of *F. graminearum* as a function of temperature (T), relative humidity (RH) and the presence or absence of BCAs using a two-step modelling approach, including primary and secondary modelling. Data from *in vitro* experimental previous study focusing on the impacts of different temperature and relative humidity on the growth of the three BCAs, on the growth and mycotoxinogenesis of *F. graminearum* and on their interactions (Dieye & al., 2023) were used.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design

An experimental design was used with four incubation temperatures (20°C, 25°C, 30°C, and 33°C) and four relative humidity level (40%, 50%, 60%, and 80%) tested as explanatory variables, resulting in 16 treatments that would represent the different abiotic conditions. Temperatures and relative humidities were chosen in intervals where each of the microorganisms could evolve with climate change. Two bioclimatic enclosures (© ICH750 C, Memmert, Schwabach, Germany) were used to adjust the different temperatures and relative humidity. The chamber ventilation has been set to its lowest level.

The variables to be explained (measured variables) were the growth (colony area) of BCA and *Fusarium graminearum* and DON production. For the allocations, each treatment was applied on 5 experimental units with 5 repetitions each. *F. graminearum* was confronted with each BCA, the pathogen alone and each BCA alone were used as control.

2.2. Microorganisms and culture conditions

2.2.1. *Fusarium graminearum strain*

F. graminearum strain BRFM 1967 was used (CIRM, University of Aix-Marseille, Marseille, France), and chosen for its high capacity to produce mycotoxins. Isolated from a wheat plant, it has a deoxynivalenol/15-Acetyldeoxynivalenol/3-Acetyldeoxynivalenol (DON/15-AcDON/3-AcDON) chemotype. The strain was maintained on potato dextrose agar (PDA: BD Difco, Sparks, MA, USA) under paraffine oil at 4°C and actively grown on PDA at

25 °C for 7 days for spore production. Spore suspension was prepared from solid medium in sterile water-Tween (wT, 0.01%) and filtered with carded cotton.

2.2.2. Commercial biological control agents (BCAs)

Three commercial biological control agents (BCAs) were selected for their contrasting characteristics (Pellan et al., 2021). All strains were isolated from their commercial product with a classical microbial isolation protocol (serial dilution and multiple striation inoculation), on an appropriate medium (supplemented with 0.01% tetracycline for *Pythium oligandrum* only). BCAs were stored under spore form in glycerol solution (15%/-80 °C). Strains were actively grown on ISP4, PDA and V8 respectively for *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) and *Pythium oligandrum* (Polyversum®) at 25 °C for 7 days for spore production. For the rest of the study, strains isolated from commercial products were designated using their commercial name: Mycostop® for *S. griseoviridis*, Xedavir® for *T. asperellum*, and Polyversum® for *P. oligandrum*.

2.3. Culture media and growth evaluation

On Czapeck yeast agar (CYA) medium, each BCA and the pathogen were inoculated in a Petri dish at the same distance from the center of plate. The pathogen and BCAs were inoculated with the spore suspension except Polyversum, which was inoculated with 7- day plugs (5 mm in diameter). The BCAs (5 µL $\times 10^5$ spores mL^{-1} or plug) and the pathogen (45 mm from BCA, 5 µL $\times$ 10^4 spores mL^{-1}) were inoculated at the same time. Plates were incubated at the defined temperature and relative humidity in the dark for 12 days using bioclimatic enclosure. Microorganisms were grown on Petri dish placed in a climatic chamber. This experimental set-up mimicked the hyphal development on plants. Part of the fungal mycelium was in contact with high water activity medium although the aerial mycelium was exposed to ambient atmosphere where RH was controlled. The water activity (a_w) of the culture media was measured with an aw-meter (GBX, model FA-st / 1) to ensure that the water activity (a_w) in the culture media did not fall below 0.98 during the 12 days of the experiment. Plates inoculated with the pathogen alone and BCAs alone were used as control treatment. Petri dishes were photographed on days 3, 5, 7, 10 and 12 and the colony area of each BCA/pathogen was measured in cm^2 using ImageJ software (1.52v, Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, 2018). Values were used to create a growth curve. Each BCA/pathogen confrontation and control were set up in quintuplicate for each analyzed day and two independent repetitions of the test were done.

2.4. Deoxynivalenol extraction and analysis

After growth evaluation, each confrontation plate was submitted to a mycotoxin analysis. The extraction procedure described by (Pellan et al., 2020) was used. Half petri dish was sampled by cutting along the line formed by the two inoculation points, and finely cut and weighed. *F. graminearum* confronted or alone, 30 mL of acetonitrile/water/acetic acid (79:20:1, v/v/v) were added and samples were homogenized by mechanical agitation for 20 minutes at 250 rpm. Then samples were diluted 1:50 in water/acetic acid (99.5:0.5, mobile phase A of analyzer) and filtered with a CA filter (0.45 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

Mycotoxin detection and quantification described bye (Moreau and Levi, 2014) were achieved using an Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled with a mass spectrometer (8040, Shimadzu, Tokyo, Japan). LC separation was performed using a Phenomenex Kinetex XB Column C18 (50 mm × 2 mm; 2.6 µm particles) at 50 °C, with an injection volume of 50 µL. Mobile phage composite was (A) 0.5% acetic acid in ultra-pure water and (B) 0.5% acetic acid in isopropanol (HPLC MS grade, Sigma, St Louis, MO, USA), and the mobile phase flow rate was 0.4 $mL.min^{-1}$. The mass spectrometer was operated in electrospray positive (ESI+) and negative (ESI-) ionization mode, and two multiple reaction monitoring (MRM) transitions for each analyte were monitored for quantification (Q) and qualification (q). All data were analyzed using LabSolutions Software (v5.91/2017, Shimadzu, Tokyo, Japan, 2017). Limits of detection or quantification (LOD/LOQ in ng mL^{-1}) for DON were (5/15) Mycotoxin levels were expressed in ng. g^{-1} of medium or $ng.cm^{-2}$, respectively for global and specific mycotoxin production. Values were used to create global and specific mycotoxin production curve. Each BCA/pathogen confrontation and control mycotoxin analysis was set up in quintuplicate for each measurement day, and two independent repetitions of the test were done.

2.5. Model development for *Fusarium graminearum* and BCAs growths

With the aim of developing models capable of predicting the three BCAs and *F. graminearum* growth rate as a function of temperature (T) and relative humidity (RH), a two-step modelling approach, including primary and secondary modelling, was applied.

Gompertz modified equation by Zwietering et al. (1990) (Equation 1) was fitted using (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.), for each strain, to the growth data (colony radius) against time to estimate the maximum colony growth rate (μ_{max}, cm/h), the lag phase prior to growth (λ, h), and the maximum colony radius (y_{max}, cm). All growth data was fitted for each treatment (16 conditions) resulting 16 y_{max}, 16 λ and 16 μ_{max} for each microorganism.

Then, the individual effect of temperature and relative humidity on the estimated growth parameters was performed using a multiple linear regression analysis for BCAs only (Equations 2-4). For *F. graminearum*, the estimated growth parameters curve was bell-shaped around 25°C. A change in variables was employed (Equations 5-7) using a nonlinear regression analysis for modelling the effect of temperature on the estimated growth parameters of *F. graminearum*.

Finally, the equations (2-7) obtained with the secondary modelling approach were substituted in the primary model equation (1) to have a global model including temperature, relative humidity, and time for each strain. If the coefficient of determination (R^2) of the equation (5-7) was inferior to 70%, the mean of the parameter in the 16 conditions was considered.

$$y = y_{max} \times \exp\left\{-exp\left[\left(\frac{\mu_{max} \times \exp(1)}{y_{max}}\right)(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

Where y_{max}, μ_{max} and λ are the estimated growth parameters through the non-linear regression algorithm.

- y: colony radius (cm)
- y_{max}: maximum colony radius (or diameter) attained, asymptotic value (cm)
- μ_{max}: maximum specific growth rate (it is defined as the slope of the growth curve at the point of inflexion) (cm/h)
- λ: lag period (defined as the intersection of the line defining the maximum specific growth rate with the x axis) (h)
- t: time (h)

$$y_{\max(i)} = a_{ymax(i)}T + b_{ymax(i)} \quad (2)$$
$$\mu_{\max(i)} = a_{\mu\max(i)}T + b_{\mu\max(i)} \quad (3)$$
$$\lambda_{(i)} = a_{\lambda(i)}T + b_{\lambda(i)} \quad (4)$$

$$y_{\max(G)} = a_{ymax(G)} + b_{ymax(G)} \times ABS(T - 25) \quad (5)$$
$$\mu_{\max(G)} = a_{\mu\max(G)} + b_{\mu\max(G)} \times ABS(T - 25) \quad (6)$$
$$\lambda_{(G)} = a_{\lambda(G)} + b_{\lambda(G)} \times ABS(T - 25) \quad (7)$$

- *(i)*: BCAs: Mycostop (M), Xedavir (X) or Polyversum (P)
- *T*: temperature
- *(G)*: *F. graminearum*
- *ABS*: valeur absolue

2.6. Modelling deoxynivalenol (DON) production

For mycotoxin production, a three-step modelling approach was employed.

In the first step, a second-order polynomial equation obtained with Gibson model transformed Gibson et al. (1994) (Equation 8) was fitted to the DON specific production data (on day 5,7, 10 & 12) to describe the effect of temperature and relative humidity on the production of DON

by *F. graminearum* alone and confronted with BCAs. The value of relative humidity (RH) was transformed to *rh* (Equation 9) to have a better hyperbolic fitting, as suggested by Gibson et al. (1994).

$$ln_{(DON)} = a_0 + a_1 rh + a_2 rh^2 + a_3 T + a_4 T^2 + a_5 rhT \quad (8)$$

$$rh = \sqrt{100\% - RH} \quad (9)$$

Where a_0, a_1, a_2, a_3, a_4 and a_5 are coefficients to be estimated using nonlinear regression.

In a second step, for each day of measurement (5, 7, 10 & 12), the estimated parameters were grouped into kinetics to incorporate time (*t*) into the model. Each estimated parameter was modeled as a function of time by a linear regression.

$$a_{0(i)} = b_{(a_{0(i)})} t + c_{(a_{0(i)})} \quad (10)$$

$$a_{1(i)} = b_{(a_{1(i)})} t + c_{(a_{1(i)})} \quad (11)$$

$$a_{2(i)} = b_{(a_{2(i)})} t + c_{(a_{2(i)})} \quad (12)$$

$$a_{3(i)} = b_{(a_{3(i)})} t + c_{(a_{3(i)})} \quad (13)$$

$$a_{4(i)} = b_{(a_{4(i)})} t + c_{(a_{4(i)})} \quad (14)$$

$$a_{5(i)} = b_{(a_{5(i)})} t + c_{(a_{5(i)})} \quad (15)$$

Where *b* and *c* are coefficients to be estimated for each parameter using linear regression.

- *(i): F. graminearum alone (G),* confronted with Mycostop® *(GM)* or Xedavir® *(GX)*

In the last step, for each modality (G, GM et GX), the $a_{0(i)}$ to $a_{5(i)}$ were presented as a model (Equations 10 to 15). The mean of the *b* for all modalities was calculated representing the coefficient of time in the final model. The constants (*c*) for each modality were maintained and multiplied by their corresponding modality. Each modality takes the value of 0 or 1 in the final model depending on the confrontation. Equation 8 was rewritten by replacing each coefficient by the corresponding final model including time, temperature, relative humidity, and BCAs.

$$\begin{aligned} ln_{(DON)} = &\left(mean\, b_{(a_{0(G)};a_{0(GM)};a_{0(GX)})} \times t + c_{(a_{0(G)})} \times G + c_{(a_{0(GM)})} \times GM + c_{(a_{0(GX)})} \times GX\right) \\ &+ \left(mean\, b_{(a_{1(G)};a_{1(GM)};a_{1(GX)})} \times t + c_{(a_{1(G)})} \times G + c_{(a_{1(GM)})} \times GM + c_{(a_{1(GX)})} \times GX\right) \times RH \\ &+ \left(mean\, b_{(a_{2(G)};a_{2(GM)};a_{2(GX)})} \times t + c_{(a_{2(G)})} \times G + c_{(a_{2(GM)})} \times GM + c_{(a_{2(GX)})} \times GX\right) \times RH^2 \\ &+ \left(mean\, b_{(a_{3(G)};a_{3(GM)};a_{3(GX)})} \times t + c_{(a_{3(G)})} \times G + c_{(a_{3(GM)})} \times GM + c_{(a_{3(GX)})} \times GX\right) \times T \\ &+ \left(mean\, b_{(a_{4(G)};a_{4(GM)};a_{4(GX)})} \times t + c_{(a_{4(G)})} \times G + c_{(a_{4(GM)})} \times GM + c_{(a_{4(GX)})} \times GX\right) \times T^2 \\ &+ \left(mean\, b_{(a_{5(G)};a_{5(GM)};a_{5(GX)})} \times t + c_{(a_{5(G)})} \times G + c_{(a_{5(GM)})} \times GM + c_{(a_{5(GX)})} \times GX\right) \times RH \times T \end{aligned}$$

Equation (16): Where G, GM and GX = 0 or 1: when $ln_{(DON)}$ for G alone was calculated, G=1; GM=0; GX=0

when $ln_{(DON)}$ for G confronted with Mycostop was calculated, G=0; GM=1; GX=0

when ln $_{(DON)}$ for G confronted with Xedavir was calculated, G=0; GM=0; GX=1

2.7. Evaluation of model's performance

Performances of the developed models were assessed using the bias factor (B_f), accuracy factor (A_f) and the root mean squared error (RMSE) as proposed by Ross, (1996). $B_f < 1$ indicates that the model is 'fail-safe', while $B_f > 1$ could lead to 'fail dangerous' predictions as the observed values are larger than the predicted values. A_f indicates the average difference between the predicted and observed values. RMSE measures the 'goodness-of-fit 'or the precision of a predictive model (lower RMSE value indicates that the data is more precisely described) (Ross, 1996).

- For growth models

$$B_f = 10^{(\sum \log (y_{max\,predicted}/y_{max\,observed})/n)}$$

$$A_f = 10^{(\sum |\log (y_{max\,predicted}/y_{max\,observed})|/n)}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_{max\,predicted} - y_{max\,observed})^2}{p-n}}$$

- For DON production model

$$B_f = 10^{(\sum \log (ln\,DON_{predicted}/\,ln\,DON_{observed})/n)}$$

$$A_f = 10^{(\sum |\log (ln\,DON_{predicted}/\,ln\,DON_{observed})|/n)}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (ln\,DON_{predicted} - ln\,DON_{observed})^2}{p-n}}$$

Where *n* is the number of observations and *p* is the number of parameters to be estimated in the model.

2.8. Statistical analysis

Statistical data analysis was performed with R Software (3.4.4, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017) and Minitab21 Statistical Software (Quality Plaza, 1829 Pine Hall Rd, State College PA 16801-3210, USA) was used for figures. Normality and homogeneity of variances were checked with the Shapiro-Wilk test (with Holm-Bonferroni correction) and Levene's test, respectively. For each microorganism (BCA and pathogen), the effect of abiotic factors was tested with a one-way ANOVA and multiple comparisons of means were done with Tukey's HSD pairwise comparison test ($\alpha = 0.05$).

3. Results

3.1. Effect of temperature and relative humidity on the growth of *F. gaminearum* and BCAs

The effect of temperature and RH on the growth kinetic of the different microorganisms is represented in Figure 1. The highest temperature (33°C) inhibits *F. graminearum* growth (Figure 1.A). The colony area of the BCAs at 12 days increases with increasing temperature (Figure 1.B, C and D). These results indicate that increasing temperatures negatively affect the growth of the pathogen and positively the BCAs growth. However, relative humidity variation has no effect on the growth of the BCAs or *F. graminearum*. Statistical analysis of variance (ANOVA), comparisons of the effect of the combination of RH and temperature on growth of BCAs and *F. graminearum* exhibits that considered together, these factors have the same effect on growth as temperature alone (ANOVA test, *p-value* <0.05). Maximum growth of the pathogen was observed at 25°C/40%, 50%, 60% and 80% RH (Figure 1.A) confirming that temperature has a prevalent influence toward relative humidity on microbial growth.

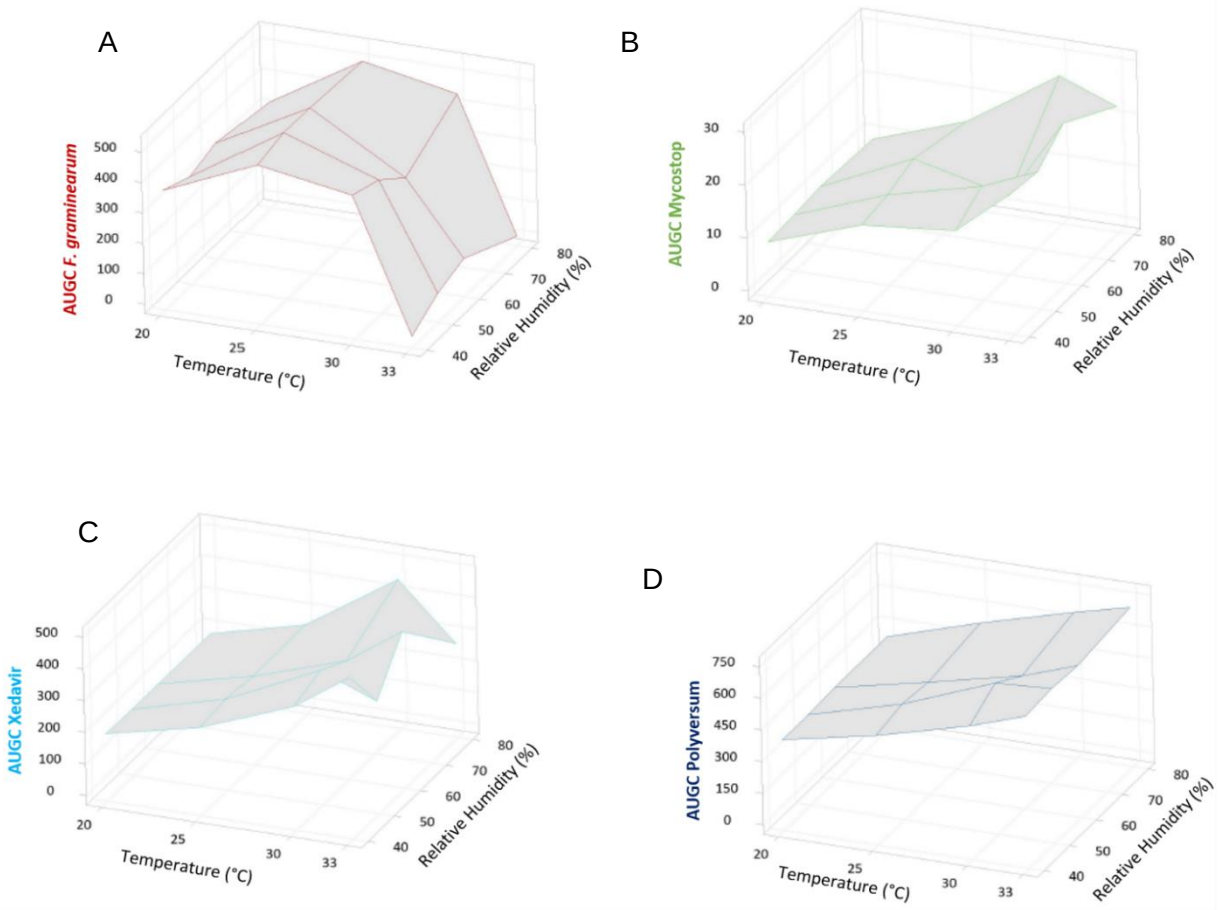


Figure 1. Comparative effects of abiotic factors on the growth of BCAs and *Fusarium graminearum*. All microorganisms were cultivated alone on CYA medium for 12 days. (A) impact of temperature (T°) and relative humidity (RH) on the growth of *F. graminearum*, (B) Mycostop®, (C) Xedavir® and (D) Polyversum®. Growth levels are expressed in the area

under growth curve (AUGC).

3.1.1. Primary modelling

Applying the modelling procedure introduced above, the primary model of Gompertz modified by Zwietering et al. (1990) was fitted to the related experimental data to estimate the maximum colony growth rate (μ_{max}) based on tracking the daily increase in colony radius, the lag phase (λ), and the maximum colony radius (y_{max}) (Table 1 A-B). The model fit well to the growth curves for all studied strains (R^2 values >0.97) in all conditions, except 33°C, regardless of RH for *F. graminearum* (Table 2). The impact of temperature can be observed in the different μ_{max} values of all models where, in general, the growth rate of colonies tended to increase with temperature for BCAs. However, for *F. graminearum*, beyond the optimal temperature (25°C), the growth rate decreased and tended to cancel out beyond 30°C progressively with each increase in temperature. The highest colony growth rate for *F. graminearum* was observed at 25°C regardless of RH. There was no significant difference observed in the maximum colony growth (y_{max}) of *F. graminearum*, Xedavir and Polyversum at 25°C and 30°C. The growth of Mycostop was slower than the two other BCAs and the pathogen.

Table 1 A. Estimated growth parameters of the Gompertz modified equation (1), to estimate the effect of temperature and relative humidity on the growth rate of *F. graminearum* and Mycostop. ANOVA test, *p-value* <0.05, y_{max} and μ_{max} comparisons (a, b, c, d).

			F. graminearum			Mycostop©		
Condition	T° (C)	RH (%)	y_{max} (cm)	μ_{max} (cm/h)	λ (h)	y_{max} (cm)	μ_{max} (cm/h)	λ (h)
T20HR40	20	40	5.08 ± .436^a	.046 ± .010^b	46.93 ± 10.1	.653 ± .048^c	.012 ± .005^a	45.769 ± 9.93
T20HR50	20	50	4.62 ± .352^a	.046 ± .009^b	45.97 ± 9.11	.686 ± .061^c	.009 ± .003^a	41.510 ± 11.6
T20HR60	20	60	5.08 ± .346^a	.046 ± .007^b	49.43 ± 7.95	.812 ± .118^b	.006 ± .002^a	34.171 ± 16.6
T20HR80	20	80	4.67 ± .407^a	.043 ± .009^b	43.94 ± 10.3	.623 ± .050^c	.019 ± .013^b	50.843 ± 12.8
T25HR40	25	40	5.01 ± .085^a	.131 ± .025^a	53.51 ± 3.55	.825 ± .061^b	.022 ± .012^b	49.915 ± 11.1
T25HR50	25	50	5.02 ± .062^a	.138 ± .021^a	53.58 ± 2.79	.851 ± .038^b	.029 ± .019^b	53.424 ± 12.3
T25HR60	25	60	5.05 ± .050^a	.134 ± .020^a	54.63 ± 2.49	1.02 ± .111^a	.011 ± .004^c	37.651 ± 13.7
T25HR80	25	80	5.24 ± .172^a	.082 ± .013^a	49.14 ± 4.18	.818 ± .070^b	.026 ± .018^b	50.926 ± 13.8
T30HR40	30	40	5.13 ± .263^a	.063 ± .011^b	45.96 ± 6.31	.834 ± .052^b	.038 ± .042^a	53.026 ± 21.1
T30HR50	30	50	5.09 ± .450^a	.051 ± .013^b	42.46 ± 10.6	.940 ± .019^a	.035 ± .012^a	53.504 ± 6.45
T30HR60	30	60	4.76 ± .389^a	.044 ± .009^b	42.57 ± 9.69	.745 ± .039^b	.033 ± .030^a	52.970 ± 17.1
T30HR80	30	80	5.15 ± .276^a	.062 ± .011^b	45.50 ± 6.58	1.09 ± .080^a	.033 ± .020^a	50.929 ± 11.9
T33HR40	33	40	.000 ± .000^c	.000 ± .000^d	.000 ± .00	1.06 ± .042^a	.037 ± .018^a	52.668 ± 9.25
T33HR50	33	50	3.03 ± .014^b	.027 ± .000^c	100.2 ± .414	1.06 ± .098^a	.032 ± .024^a	50.755 ± 14.7
T33HR60	33	60	2.40 ±.061^b	.032 ± .003^c	52.01 ± 3.04	1.15 ± .074^a	.035 ± .019^a	51.262 ± 0.9
T33HR80	33	80	.000 ±.000^c	.000 ± .000^d	.000 ± .00	1.02 ± .068^a	.031 ± .019^a	51.537 ± 11.9

Table 1 B. Estimated growth parameters of the Gompertz modified equation (1), to estimate the effect of temperature and relative humidity on the growth rate of Xedavir and Polyversum. ANOVA test, *p-value* <0.05, y_{max} and μ_{max} comparisons (a, b, c, d).

			Xedavir©			Polyversum©		
Condition	T° (C)	RH (%)	y_{max} (cm)	μ_{max} (cm/h)	λ (h)	y_{max} (cm)	μ_{max} (cm/h)	λ (h)
T20HR40	20	40	4.83 ± .678^{a}	.038 ± .010^{c}	85.089 ± 13.6	4.49 ± .242^{a}	.097 ± .035^{c}	49.216 ± 7.82
T20HR50	20	50	2.82 ± .188^{c}	.028 ± .005^{d}	50.912 ± 7.94	4.31 ± .280^{a}	.148 ± .110^{b}	52.423 ± 14.2
T20HR60	20	60	3.05 ± .271^{b}	.026 ± .005^{d}	52.819 ± 10.2	4.26 ± .296^{a}	.146 ± .115^{b}	52.386 ± 15.1
T20HR80	20	80	2.51 ± .208^{c}	.023 ± .005^{d}	49.751 ± 9.72	4.26 ± .296^{a}	.148 ± .123^{b}	52.547 ± 15.7
T25HR40	25	40	4.24 ± .608^{a}	.035 ± .011^{c}	35.711 ± 16.5	4.44 ± .225^{a}	.255 ± .764^{a}	53.847 ± 54.3
T25HR50	25	50	3.95 ± .439^{a}	.047 ± .018^{b}	41.952 ± 13.9	4.56 ± .190^{a}	.271 ± 1.04^{a}	54.129 ± 68.9
T25HR60	25	60	4.17 ± .540^{a}	.037 ± .012^{c}	37.928 ± 15.3	4.49 ± .208^{a}	.259 ± .687^{a}	53.772 ± 48.2
T25HR80	25	80	4.75 ± .478^{a}	.034 ± .006^{c}	43.998 ± 10.4	4.69 ± .143^{a}	.248 ± .306^{a}	53.740 ± 22.4
T30HR40	30	40	3.97 ± .038^{a}	.137 ± .026^{a}	54.205 ± 3.31	4.82 ± .094^{a}	.174 ± .073^{b}	54.261 ± 7.36
T30HR50	30	50	4.16 ± .006^{a}	.168 ± .014^{a}	55.789 ± 1.34	4.71 ± .246^{a}	.150 ± .074^{b}	51.700 ± 9.65
T30HR60	30	60	3.73 ± .093^{a}	.142 ± .058^{a}	53.323 ± 7.51	4.85 ± .107^{a}	.164 ± .051^{b}	53.225 ± 5.74
T30HR80	30	80	4.22 ± .017^{a}	.165 ± .023^{a}	55.047 ± 2.37	4.98 ± .016^{a}	.184 ± .020^{b}	55.321 ± 1.79
T33HR40	33	40	4.93 ± .141^{a}	.104 ± .021^{a}	50.661 ± 4.28	5.02 ± .152^{a}	.154 ± .050^{b}	52.382 ± 6.24
T33HR50	33	50	4.23 ± .302^{a}	.058 ± .017^{b}	43.281 ± 9.16	4.74 ± .254^{a}	.149 ± .074^{b}	51.575 ± 9.68
T33HR60	33	60	4.78 ± .067^{a}	.124 ± .019^{a}	53.293 ± 2.86	4.85 ± .126^{a}	.257 ± .253^{a}	53.665 ± 17.9
T33HR80	33	80	4.02 ± .372^{a}	.043 ± .012^{b}	39.814 ± 11.5	4.80 ± .274^{a}	.145 ± .072^{b}	51.241 ± 9.77

Table 2. Coefficients of determination (R^2) and RMSEs for estimated growth parameters of the Gompertz modified equation (1) for the four species.

	F. graminearum		Mycostop©		Xedavir©		Polyversum©	
Condition	R^2	RMSE	R^2	RMSE	R^2	RMSE	R^2	RMSE
T20HR40	0.981	0.140	0.968	0.005	0.979	0.096	0.981	0.139
T20HR50	0.982	0.111	0.964	0.006	0.987	0.290	0.968	0.228
T20HR60	0.988	0.085	0.950	0.009	0.983	0.043	0.964	0.254
T20HR80	0.979	0.129	0.953	0.007	0.982	0.032	0.964	0.255
T25HR40	0.998	0.018	0.961	0.100	0.950	0.247	0.981	0.152
T25HR50	0.999	0.010	0.985	0.004	0.953	0.241	0.987	0.108
T25HR60	0.999	0.007	0.958	0.014	0.954	0.228	0.984	0.129
T25HR80	0.995	0.049	0.947	0.014	0.982	0.094	0.993	0.061
T30HR40	0.990	0.088	0.971	0.008	0.999	0.004	0.997	0.025
T30HR50	0.975	0.192	0.997	0.001	0.999	0.001	0.980	0.174
T30HR60	0.981	0.124	0.979	0.005	0.995	0.025	0.996	0.033
T30HR80	0.999	0.093	0.962	0.018	0.999	0.001	0.999	0.001
T33HR40	0.000	0.000	0.988	0.005	0.995	0.044	0.993	0.065
T33HR50	0.786	0.223	0.940	0.027	0.977	0.139	0.979	0.184
T33HR60	0.810	0.231	0.970	0.015	0.999	0.011	0.995	0.047
T33HR80	0.000	0.000	0.967	0.013	0.970	0.150	0.976	0.213

3.1.2. Secondary modelling

To obtain a global model including temperature, relative humidity and time for each strain, a secondary modelling was performed. This method was used to determine the interaction between the different estimated growth parameters, temperature, and relative humidity. The results confirmed the impact of temperature on the growth of the four strains and no impact of the relative humidity. For each growth model, the values of the colony radius observed, predicted by equation (1), and predicted by the final equation (final model) are represented as a function of time and the different temperatures (Figure 2-5). In general, the growth curves based on the changes in the colony radius over time formed a straight line (linear) after a short

period of lag phase followed by a stationary phase corresponding when the colony reached the edge of the Petri dish. For the crop pathogen *F. graminearum*, the lag phase was similar for all temperature levels (≈ 48 hours) while a rapid increase in the colony size followed by a stationary phase was observed at 25°C compared to other temperatures where the growth phase was slower (Figure 2). For the Mycostop, a stationary phase was observed with the final model predicted growth curve starting from 148 hours. Considering that Mycostop is a slow-growing actinomycete, this stationary phase should not appear hence the slight shift with the observed values (Figure 3). For Xedavir and Polyversum, the final model prediction values are well correlated to observed growth values. Their colonies increased with increasing temperature and reached the edge of the Petri dish after 168 hours of growth corresponding to their growth stationary phase (Figure 4-5).

$$y_{(F.graminearum)} = 4.797 \times \exp\left\{-exp\left[\left(\frac{(0.119 - 0.013 \times ABS(T-25)) \times exp(1)}{4.797}\right) \times (48.128 - t) + 1\right]\right\}$$

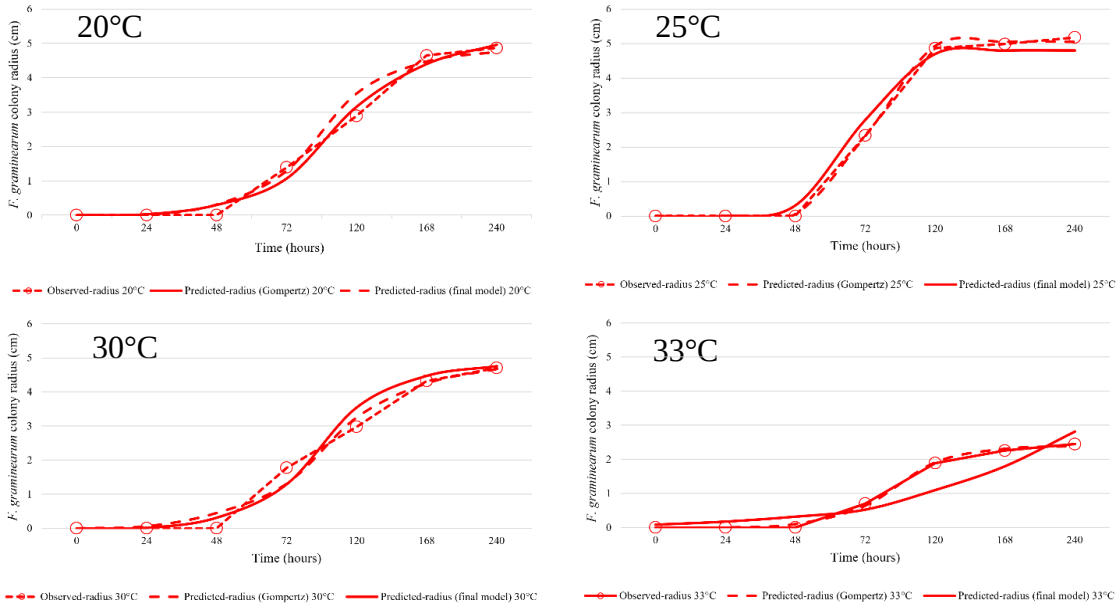


Figure 2. *Fusarium graminearum*: Comparison of the colony radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

$$y_{(Mycostop)} = (0.026T + 0.186) \times \exp\left\{-exp\left[\left(\frac{(0.002T - 0.024) \times exp(1)}{(0.026T + 0.186)}\right) \times ((0.711T + 29.605) - t) + 1\right]\right\}$$

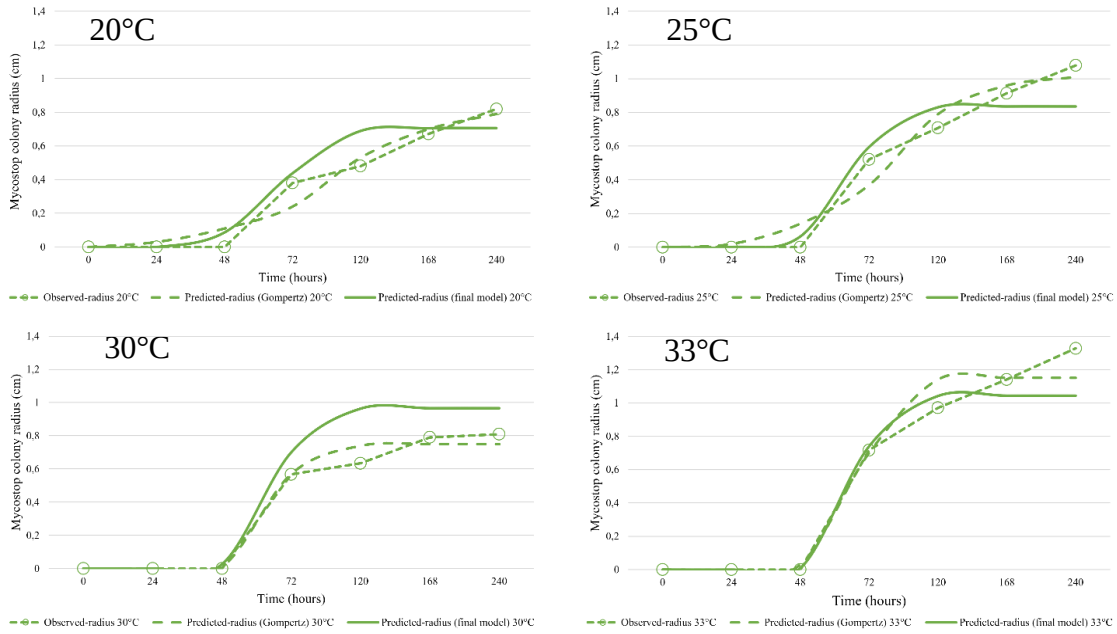


Figure 3. *Mycostop*: Comparison of the colony radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

$$y_{(Xedavir)} = (0.075T + 2.004) \times \exp\left\{-exp\left[\left(\frac{(0.007T - 0.11) \times exp(1)}{(0.075T + 2.004)}\right) \times ((-0.54T + 75.515) - t) + 1\right]\right\}$$

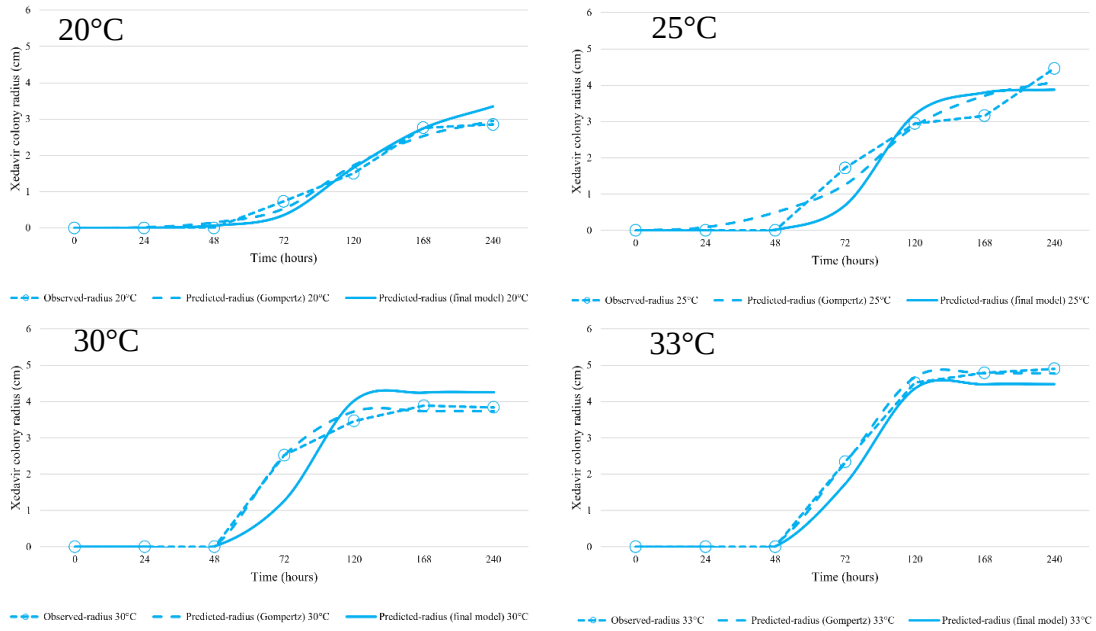


Figure 4. *Xedavir*: Comparison of the colony radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the

final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

$$y_{(Polyversum)} = (0.043T + 3.476) \times \exp\left\{-exp\left[\left(\frac{(0.001T + 0.156) \times exp(1)}{(0.026T + 0.186)}\right) \times \left((0.022T + 51.555) - t\right) + 1\right]\right\}$$

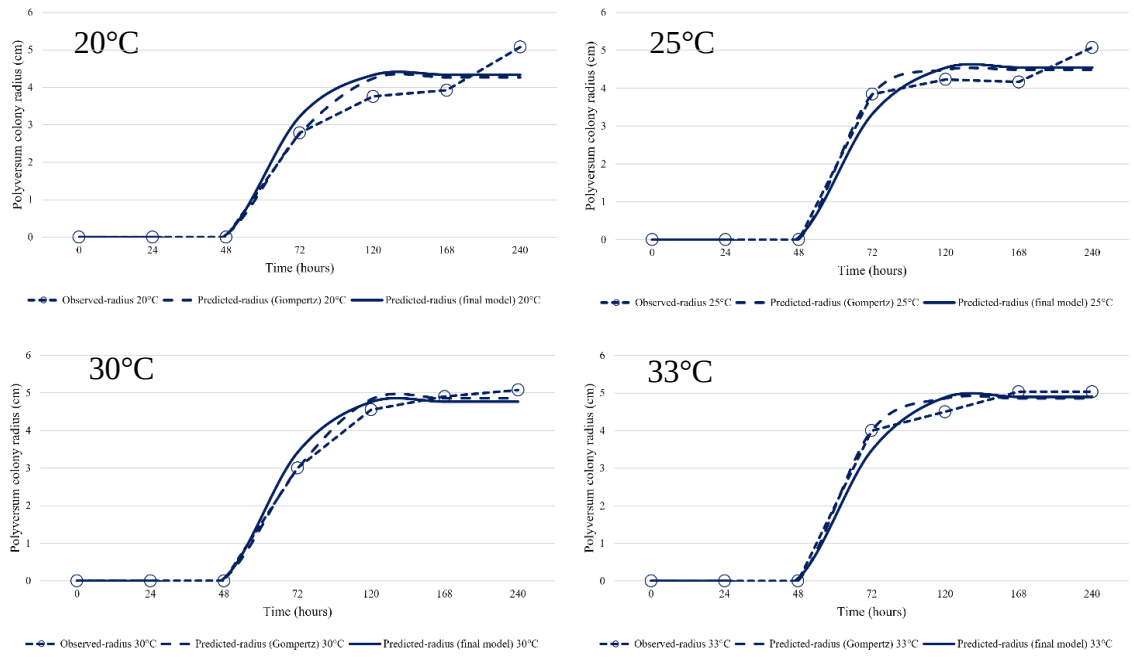


Figure 5. *Polyversum*: Comparison of the colony radius observed (discontinuous line with dot), predicted by Gompertz modified equation (discontinuous line without dot) and predicted by the final equation (final model) (continuous line) at different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) regardless of RH.

3.1.3. Predicted versus observed growth values.

The validation of each growth model was performed using predicted data (final model equation) versus observed colony growth data at all temperature and regardless RH. The graphical comparison of the observed versus predicted colony growth for each model is depicted in Figure 6. Strong correlations were observed between the predicted and observed values of all species: *F. graminearum* (R^2 = 0.973), Mycostop (R^2 = 0.920), Xedavir (R^2 = 0.946) and Polyversum (R^2 = 0.979).

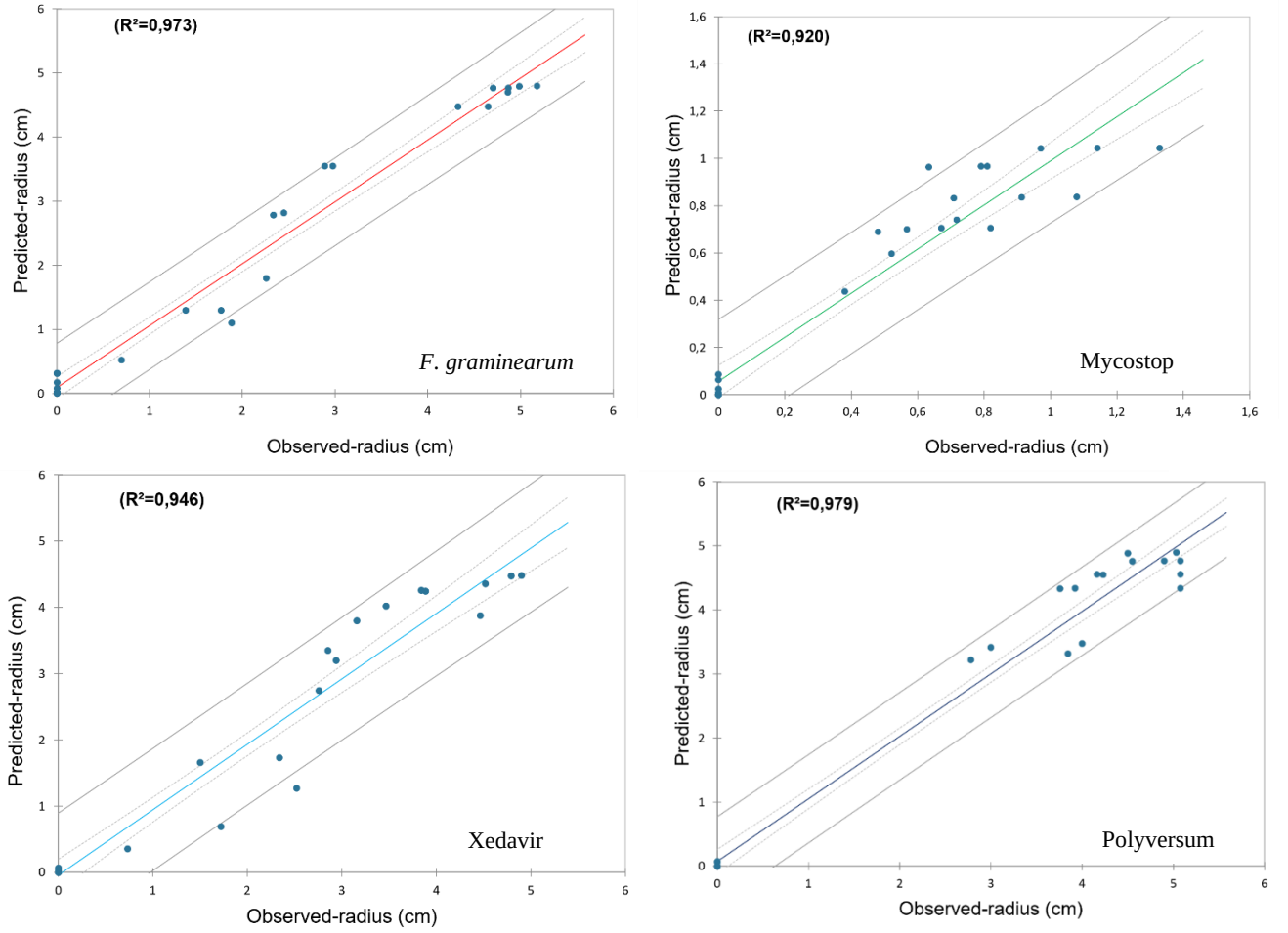


Figure 6. Predicted growth values obtained with the final model versus observed growth values of all strains: *Fusarium graminearum* (red line), Mycostop (green line), Xedavir (sky blue line) and Polyversum (dark blue line). The dark grey line represents the limit of the highest values, light gray line represents the limit of the lowest values.

3.2. Effect of temperature, relative humidity, and BCAs on the accumulation of mycotoxins

3.2.1. Modelling the DON production

To obtain a global mycotoxin (DON) model, a three-step modelling process was performed. This method was used to determine the interaction between DON specific production by *F. graminearum*, abiotic factors and BCAs. The impact of T° and RH (%) variations on predicted DON specific production is represented in Figure 7. *F. graminearum* specifically produced the highest amount of DON at 25°C. This production decreased at the other temperatures and was almost zero at 33°C. RH factor considered independently of temperature had no effect on mycotoxin production. Temperature was combined to BCA treatments at 20°C, 25°C, 30°C,

and 33°C and their effect on DON production is represented in Figure 8 comparing the mycotoxin model values with observed values. DON was not detected at temperature 33°C even though the fungal growth was weakly observed. DON production was inhibited by all BCAs at 25°C and 30°C especially Polyversum (ANOVA test, *p-value* <0.05) which was the only BCA that highly inhibits this production (Figure 6) (Dieye et al., 2023).

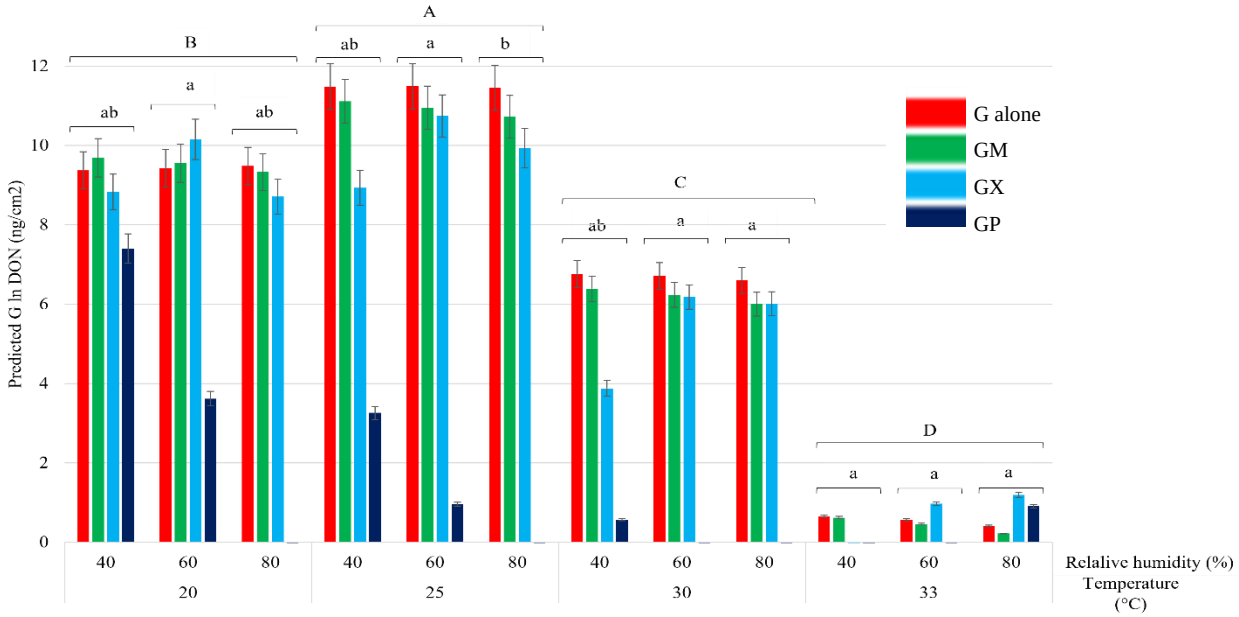


Figure 7. Comparative effects of abiotic conditions on DON production by *F. graminearum* (alone or confronted): combined T° and RH (%) variations on predicted DON specific production. All tested conditions were performed on CYA medium for 12 days. Mycotoxin specific production levels are expressed in ln DON (ng/cm^2). ANOVA test, *p-value* <0.05: T° effect on DON specific production comparisons (A, B, C & D); RH effect on DON specific production comparisons (a, b, c…). G alone represents the DON specific production by *F. graminearum* alone (red), GM: *F. graminearum* confronted with Mycostop (green), GX: *F. graminearum* confronted with Xedavir (Sky blue) and GP: *F. graminearum* confronted with Polyversum (Dark blue).

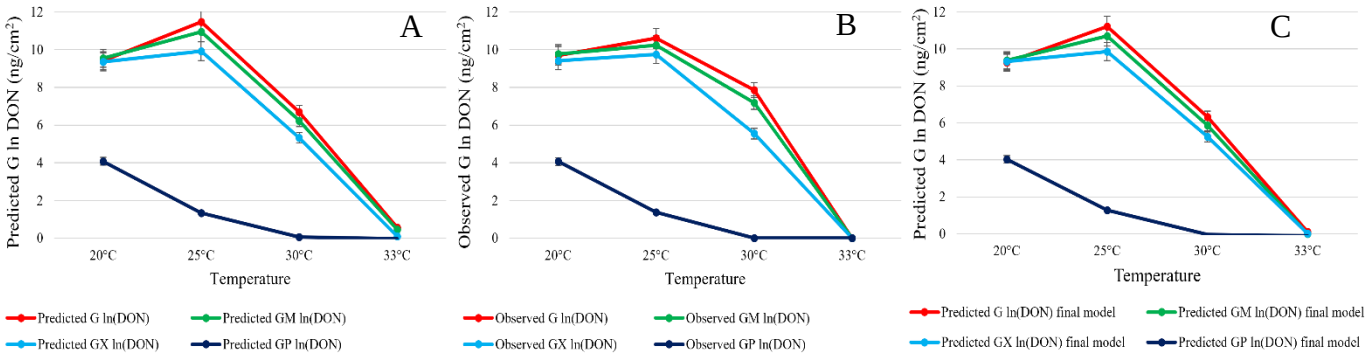


Figure 8. Comparative effects of BCA treatments and temperature (T°) variations regardless RH on DON specific production by *F. graminearum*: predicted DON specific production values (ln DON) obtained with a polynomial model (Fig 8. A) observed DON specific production values (Fig 8. B) and predicted the final mycotoxin model (Fig 8. C). G represents the DON specific production of *F. graminearum* alone (red line), GM: *F. graminearum* confronted with Mycostop (green line), GX: *F. graminearum* confronted with Xedavir (Sky blue line) and GP: *F. graminearum* confronted with Polyversum (Dark blue line).

$$
\begin{aligned}
ln_{(DON)} = {} & (-3.858t - 16.78G - 9.638GM - 0.647GX) \\
& + (15.885t - 157.497G - 149.569GM - 156.668GX) \times RH \\
& + (-7.35t + 79.066G + 63.217GM - 61.912GX) \times RH^2 \\
& + (-0.008t + 5.373G + 4.725GM + 4.146GX) \times T \\
& + (0.002t - 0.127G - 0.118GM - 0.109GX) \times T^2 \\
& + (-0.236t + 2.09G + 2.423GM - 2.714GX) \times RH \times T
\end{aligned}
$$

3.2.2. Predicted versus observed growth values.

The graphical comparison of the observed versus predicted values of the final mycotoxin model (Equation 16) is depicted in Figure 9. The R^2 values of all models were above 0.920 which highlights that these models fit well to the data. Strong correlations were observed between the predicted and observed values: *F. graminearum* (R^2 = 0.967), *F. graminearum* versus Mycostop (R^2 = 0.957), *F. graminearum* versus Xedavir (R^2 = 0.922). Polyversum effect on DON has not been represented because it completely inhibits the DON production.

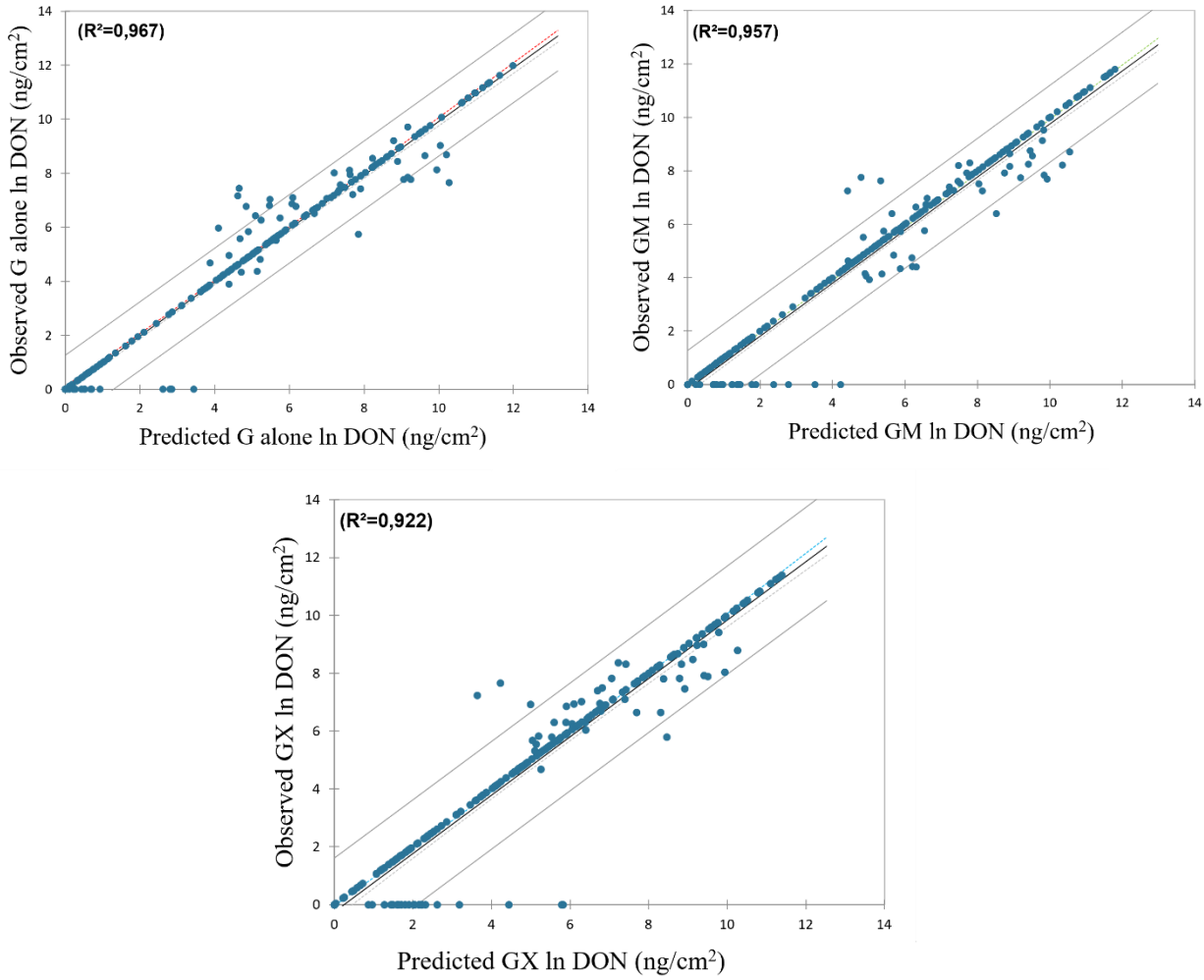


Figure 9. Predicted DON specific production values obtained with the final mycotoxin model versus observed DON specific production values of *Fusarium graminearum*. G represents the DON specific production of *F. graminearum* alone, GM the DON specific production by *F. graminearum* confronted with Mycostop and GX the DON specific production of *F. graminearum* confronted with Xedavir. All R^2 >92% indicated the good fit of predicted values.

3.3. Validation of growth and mycotoxin models

Table 3 summarizes the mathematical indices that were used to evaluate the performance of each model (growth and mycotoxin). The B_f and A_f values for growth and mycotoxin models (Gompertz modified and polynomial respectively) of all species were close to 1. Another meaningful and simple measure of the performance of the models is the RMSE. The RMSE value for growth model ranged from (FG:0.227; M:0.088; X:0.3022; P:0.225) to (FG:0.465; FG×M:0.270; FG×X:0.252) for mycotoxin model. These values indicated that the predictions of both models agreed with the validation growth and mycotoxin data. In general, both models have a $B_f < 1$, except the growth of Mycostop ($B_f = 1.017$) and Polyversum ($B_f = 1.001$), which

indicates that the models were 'fail-safe' because the two strains grow slower than predicted by the growth model. However, it is still within the acceptable range. The A_f value for the two models was close to 1, indicating that the models had a small deviation between the predicted and observed value, thus increase the model accuracy. By comparing those indices, the performance of the polynomial model for mycotoxin was like the Gompertz modified models for growth despite having a high RMSE value for FG. Consequently, indicating that the two models were able to predict the approximative means of the growth rates and DON production.

Table 3. Performance evaluation of the predictive models for the effects of temperature and relative humidity on the growth of *F. graminearum* and the three BCAs with Gompertz modified model and on the DON specific production of *F. graminearum* with polynomial model.

Models	Mathematical indices	*F. graminearum* (FG)	Mycostop (M)	Xedavir (X)	Polyversum (P)
Gompertz final model (Growth model)	Bias factor (B_f)	0.985	1.017	0.967	1.001
	Accuracy factor (A_f)	1.038	1.043	1.061	1.023
	RMSE	0.227	0.088	0.302	0.225
		FG	FG × M	FG × X	
Polynomial (Mycotoxin model)	Bias factor (B_f)	0.987	1.020	0.993	
	Accuracy factor (A_f)	1.049	1.052	1.043	
	RMSE	0.465	0.270	0.252	

4. Discussion

Despite the lack of a direct correlation between fungal growth and the presence of mycotoxins, preventing *F. graminearum* colonization of wheat spikes means avoiding mycotoxin contamination. For this reason, scientists have developed mathematical models to predict the speed of spore germination and mycelial growth (Garcia et al., 2009). In predictive microbiology, mathematical models are used to predict the growth of different microorganisms and the production of toxins, as well as the response of these microorganisms to environmental factors (Prandini et al., 2009). The application of predictive microbiology to filamentous fungi has not received the same attention as it has to bacteria. This is perhaps explained by the inherent complexities involved in quantifying fungal growth which can be evaluated through the germination of spores, followed by the growth of hyphae that form the mycelium (Gibson and Hocking, 1997).. The aim of this study was to develop models (primary and secondary) for predicting the growth evolution (radial growth) of biological control agents and *F. graminearum* and DON contamination risk in cereal crops (wheat) using *in vitro* experiments, based on abiotic conditions specific for climate evolution. Secondary models describe the influence of environmental factors on the main growth parameters (e.g., y_{max} or μ_{max}) estimated

from primary models. Few studies have been carried out on the application of secondary models for growth and toxin data, and polynomial models have been the most widely used in these cases (Halouat and Debevere, 1997). The most widely used models included: Rosso's cardinal model (Rosso et al., 1993), which was later modified by Rosso and Robinson, (2001), Ratkowsky et al.'s square root model (Ratkowsky et al., 1983), Arrhenius-Davey's linear equation (Davey, 1989), Gibson's model (A. M. Gibson et al., 1994) and other polynomial models. In this study, a new secondary modeling method based on kinetics was used to achieve better results.

Temperature elevation was shown to negatively affect the growth of the pathogen and positively the growth of BCAs (Dieye et al., 2023). The growth models made it possible to predict growth, above 33°C, for *F. graminearum*. The predictions showed that the pathogen could not grow in temperatures >33°C, which could lead to changes in its behavior (sporulation, toxin production...) or its geographical distribution. Temperature can either inhibit enzymatic reactions through enzyme denaturation in the case of higher temperatures (>33°C) or cause a reduction in the speed of enzymatic activity in the case of lower temperatures (<20°C). Indeed, most fungi are mesophilic, with growth optima ranging from 25°C to 35°C. *Fusarium* growth is favoured in temperate climates at temperatures ranging from 25°C to 28°C. This may be explained by the inactivation of spore germination due to high temperatures. A spore is considered as germinated when the germ tube measures twice the initial diameter of the spore. Germination occurs in a very short time. There are few studies on germination kinetics due to difficulties in collecting reproducible data (Dantigny et al., 2005). The increase in the percentage of germinated spores over time has been modeled by Gompertz and the logistic model. The most widely used kinetic models are those based on colony diameter measurement, which is the simplest and most reproducible technique for obtaining data. The most frequently used growth models are the linear model, the modified Gompertz equation (Zwietering et al., 1990) and the model of (Baranyi and Roberts, 1994). In this study, the modified Gompertz equation was used as the primary model to predict the growth rates of the four strains studied. The growth of fungi in solid substrates generally follows a pattern consisting of a lag phase and a linear growth phase under optimal conditions and in the absence of limiting factors. Under sub-optimal conditions, a stationary phase may occur when fungi stop growing (Angela M. Gibson et al., 1994), i.e., under conditions of limited water activity or in *in vitro* studies where the limits of the Petrie dish prevent fungal progression.

The predicted growth of *F. graminearum* showed that the lag phase was similar for all temperature levels (≈ 48 hours) while a rapid increase in the colony followed by a stationary

phase was observed at 25°C compared to other temperatures where the growth phase was slower. Similar results were obtained by Marín et al. (2010), who studied the effect of temperature in the range 15°C to 35°C on the growth rate of *F. graminearum* in Spanish wheat. They reported that the fastest growth rate (μ_{max}) was observed at 25°C, although growth rates remained high at 20°C and 30°C as in the case of this study (Table 1A). However, the same researchers noted that, at marginal temperatures i.e., 15°C and between 30°C and 35°C, growth decreased sharply for the *F. graminearum* strains studied. These results corroborate those of this study, where predictions showed an inability of *F. graminearum* to grow above 30°C. In general, optimal conditions for *Fusarium* growth vary according to species, culture media used, and temperature ranges tested. As suggested by (González et al., 1988), the optimum temperature for growth of *F. moniliforme* is probably 25°C, while *F. semitectum* reaches maximum growth at 20°C. For the BCA Mycostop, a stationary phase was observed with the final model predicted growth curve starting from 148 hours. Considering that Mycostop is a slow-growing actinomycete, this stationary phase should not appear. In the absence of non-limiting factors, Mycostop shows exponential growth after a short lag phase in the experimental data. The growth model applied biased the forecasts, presenting a stationary phase suggesting the presence of limiting factors. It would be interesting to apply a model designed for bacteria to Mycostop to correct this error. Bacteria reproduce by fission and normally grow homogeneously in a liquid medium or on surfaces, and can penetrate the host's three-dimensional matrix (Dantigny et al., 2005), facilitating their adaptation to different environmental conditions. For the BCAs Xedavir and Polyversum, the final model prediction values are well correlated to observed growth values. Their colonies increased with increasing temperature and reached the edge of the Petri dish after 168 hours of growth corresponding to their growth stationary phase. These two BCAs showed that they can adapt to high temperatures in terms of growth. It would be interesting to study the influence of these temperatures on their ability to control *F. graminearum* with a view to preventive application. (Membré and Lambert, 2008) proposed three groups of food safety-related activities as applications for predictive microbiology. On this basis, it is possible to develop: (i) new product innovation (determination of the shelf life of an existing or new product, development of a new product or process, development of a new product formulation based on the evolution of microorganisms predicted by the models); (ii) operational support (predicting the growth or toxin production of pathogens in a host plant and establishing critical control points); (iii) risk assessment (estimating the evolution of the number of microorganisms in a production chain from field to industry, assessing exposure to a pathogen and estimating the consequences of food spoilage on health

safety and the economy).

At present, there is no generalized primary model associated with mycotoxin production. In recent years, there have been several publications relating to the production of various mycotoxins in synthetic media or food substrates (Garcia-Cela et al., 2022; Hay et al., 2021; Norlia et al., 2020). This type of study quantifies total mycotoxin content per total sample weight but is not related to the weight of the fungus. The increase in mycotoxin concentration over time is the result of the increase in fungal biomass combined with the increase in specific mycotoxin production. Appropriate modeling should permit estimation of the quantity of mycotoxin produced per fungal colony surface and unit of time (specific production). To have a global mycotoxin (DON) model including temperature, relative humidity, time, and BCAs a three-step modelling process was performed. This method was used to determine the interaction between DON specific production by *F. graminearum*, abiotic factors and BCAs. Mycotoxicogenesis is defined as all factors involved in the synthesis and excretion of mycotoxins. It is often considered to be linked to fungal growth. Consequently, factors capable of influencing fungal growth will also play a role in toxinogenesis. Generally, the environmental conditions required for mycotoxin production are narrower than those required for fungal growth and are usually near optimal conditions for the development of the target species. A study by Pitt, (1993) developed certain equations to predict the rate of aflatoxin production and degradation by *A. flavus* and *A. parasiticus* as a function of fungal growth and environmental conditions. The rate of toxin formation was assumed to be proportional to growth rate and cell biomass. In the present study, specific DON production was modeled as a function of environmental conditions and the presence or absence of BCAs. In addition to environmental or extrinsic factors, the secretion of secondary metabolites by toxigenic fungal strains also depends on other factors linked to the nature of the strain, known as intrinsic factors. Thus, mycotoxin production is a combined consequence of the strain's genetic properties and environmental factors (Blumenthal, 2004).

Studies presenting secondary modeling equations for mycotoxin production are very limited (Hay et al., 2021). This is the first study presenting a complete model including abiotic, biotic factors and time. Predicted values exhibited that *F. graminearum* specifically produced the highest amount of DON at 25°C. This production decreased at the other temperatures and was almost zero at 33°C. RH factor considered independently of temperature had no effect on DON production and was limited by all BCAs at 25°C and 30°C especially Polyversum which was the only BCA that highly inhibits this production. These results agree with those of Magan et al., (2003), who showed through models the influence of temperature and aw that growth and

DON production were optimal at 25°C for the two *Fusarium* species studied (*F. graminearum* and *F. culmorum*), although *F. graminearum* grew faster and produced DON over a slightly wider a_w range. Other studies have mainly examined the effects of temperature and time. Alborch et al. (2011) and Mousa et al. (2016) demonstrated that a strain of *F. graminearum* and a strain of *F. roseum* produced DON optimally at 29°C-30°C and 25°C-26°C, respectively, on moist cracked corn (30% moisture content). Minimum temperatures for DON production were around 11°C, depending on incubation time for both strains.

Concerning BCAs, no research has proposed models of their effect on DON production by *F. graminearum*. Several other studies mostly focused on the effects of environmental factors on the production of toxins by fungi (Alborch et al., 2011; Mousa et al., 2016), and there are insufficient reports of kinetic models of toxin accumulation (Aldars-García et al., 2015; Lappa et al., 2015; Molina and Giannuzzi, 2002). The reasons for the lack of research in this area are mainly related to: (i) different strains of the same species have different toxin-producing capabilities (different strains have different sensitivities to external conditions and the growth characteristics under different environmental conditions are not consistent), and not all strains synthesize toxins (Garcia et al., 2009); (ii) there is high variability among the amounts of mycotoxins produced on a given matrix even if only mycotoxigenic strains of a species are considered (Marín et al., 2008). Therefore, mathematical modelling of mycotoxin accumulation appears to be complex.

Apart from *in vitro* studies, other authors have worked with harvest and meteorological data to develop models of DON contamination risk. Moschini and Fortugno, (1996) used linear regression to correlate meteorological variables with the incidence of *Fusarium* head blight at harvest. The time considered was from 8 days before until 26 - 32 days after heading. The weather variables considered were rain, RH> 83%, and T_{min} and T_{max}. Hooker et al. (2002) used multiple meteorological parameters to predict deoxynivalenol contamination at harvest. De Wolf et al. (2003) used a stepwise logistic regression to make predictions. For 7 days prior to anthesis they followed rain and temperature between 15°C and 30°C. For the 10 days following anthesis they measured the number of days with temperatures between 15°C and 30°C and RH> 90%.

The performance of all the models in this study was also verified by mathematical indices. The bias and accuracy factors obtained were close to the values obtained by the polynomial (Lahlali et al., 2005) and Davey models (Samapundo et al., 2005) in similar studies.

Conclusion

This study demonstrated that using the primary model of the modified Gompertz equation was able to predict the growth rates of *F. graminearum*, Mycostop, Xedavir and Polyversum at different abiotic factors (temperature and relative humidity). Validation of the mycotoxin model with the polynomial model and the growth models with the final Gompertz model proved their ability to predict specific DON production and growth rates respectively at different temperatures and relative humidity levels. These results could be representative of natural conditions mimicking the infection phase on the plant in the event of fluctuating temperature or humidity. However, the performance of the Gompertz model in simulating the growth of *F. graminearum*, Xedavir and Polyversum was better than that of Mycostop. Overall, the current results suggest conditions that should attract growers' vigilance during the wheat flowering phase, but also during crop storage, to ensure the absence or minimization of *F. graminearum* growth and DON contamination. However, the ability of *Fusarium graminearum* to produce DON is also linked to daily variations in temperature and relative humidity. It would therefore be interesting to improve the models presented by considering the influence of these fluctuations on growth and toxin production, but also on the mechanisms of BCAs.

References

Alborch, L., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2011. Effect of water activity, temperature, and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. International Journal of Food Microbiology 147, 53–57.

Aldars-García, L., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2015. An attempt to model the probability of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* under non-isothermal conditions in pistachio nuts. Food Microbiol 51, 117–129. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.013

Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marín, S., 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. International Journal of Food Microbiology 156, 60–67. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.002

Bai, G., Shaner, G., 2004. Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. Annu Rev Phytopathol 42, 135–161. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140340

Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, Special Issue Predictive Modelling 23, 277–294. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0

Blumenthal, C.Z., 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39, 214–228. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.09.002

Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. International Journal of Food Microbiology, The Fourth International Conference on Predictive Modelling in Foods 100, 187–196. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013

Davey, K.R., 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. Journal of Applied Bacteriology 67, 483–488. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02519.x

De Wolf, E.D., Madden, L.V., Lipps, P.E., 2003. Risk assessment models for wheat fusarium head blight epidemics based on within-season weather data. Phytopathology 93, 428–435. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.428

Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M., 2003. Influence of Climatic Factors on Fusarium Species Pathogenic to Cereals. European Journal of Plant Pathology 109, 755–768. https://doi.org/10.1023/A:1026090626994

Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. Food Microbiology 26, 757–769. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.014

Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. Int J Food Microbiol 23, 419–431. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90167-8

Gibson, Angela M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. International Journal of Food Microbiology, Special Issue Predictive Modelling 23, 419–431. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90167-8

Gibson, A.M., Hocking, A.D., 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. Trends in Food Science & Technology 8, 353–358. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01065-0

Goh, Y.K., Daida, P., Vujanovic, V., 2009. Effects of abiotic factors and biocontrol agents on chlamydospore formation in *Fusarium graminearum* and *Fusarium sporotrichioides*. Biocontrol Science and Technology 19, 151–167. https://doi.org/10.1080/09583150802627033

González, H.H., Resnik, S.L., Vaamonde, G., 1988. Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. Int J Food Microbiol 6, 179–183. https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90052-9

Halouat, A.E., Debevere, J.M., 1997. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. International Journal of Food Microbiology 35, 41–48. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01219-6

Hay, W.T., McCormick, S.P., Vaughan, M.M., 2021. Effects of Atmospheric CO2 and Temperature on Wheat and Corn Susceptibility to *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Contamination. Plants 10, 2582. https://doi.org/10.3390/plants10122582

Hooker, D.C., Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilincic, L., 2002. Using Weather Variables Pre- and Post-heading to Predict Deoxynivalenol Content in Winter Wheat. Plant Disease 86, 611–619. https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.611

Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. Int J Food Microbiol 103, 315–322. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002

Lappa, I., Kizis, D., Natskoulis, P., PANAGOU, E., 2015. Comparative study of growth responses and screening of inter-specific OTA production kinetics by *A. carbonarius* isolated from grapes. Frontiers in Microbiology 6.

Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D., 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain, in: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M. (Eds.), Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi: Under the Aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998–2003', EU Project (QLK 1-CT-1998–01380). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 723–730. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_7

Magan, N., Medina, A., Aldred, D., 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. Plant Pathology 60, 150–163. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02412.x

Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2010. Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT–PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. International Journal of Food Microbiology 140, 169–174. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.041

Marín, S., Hodzić, I., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2008. Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. Food Microbiol 25, 683–689. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.03.006

McMeekin, T., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T., Tamplin, M., 2008. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications, and great expectations. International Journal of Food Microbiology, 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods 128, 2–9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.026

Membré, J.-M., Lambert, R.J.W., 2008. Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment. Int J Food Microbiol 128, 10–15. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.006

Molina, M., Giannuzzi, L., 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. Food Research International 35, 585–594. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00161-2

Moreau, S., Levi, M., 2014. Highly sensitive and rapid simultaneous method for 45 mycotoxins in baby food samples by HPLC-MS/MS using fast polarity switching (POCON1480E). Am Soc Mass Spectrom. First Edition. June 1.

Moschini, R.C., Fortugno, C., 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. Eur J Plant Pathol 102, 211–218. https://doi.org/10.1007/BF01877959

Mousa, W., Ghazali, F.Mohd., Jinap, S., Ghazali, H.Mohd., Radu, S., Salama, A.E.-R., 2016. Temperature, water activity and gas composition affect the growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy. Journal of Stored Products Research 67, 49–55. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.01.003

Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D., Bertilsson, S., 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 75, 14–49. https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10

Norlia, M., Jinap, S., Nor-Khaizura, M.Ab.R., Radu, S., John, J.M., Rahman, M.A.H., Peter, M.L., Sharif, Z., 2020. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in peanut meal extract agar. International Journal of Food Microbiology 335, 108836. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108836

Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. Plant Health Instructor. https://doi.org/10.1094/phi-a-2006-1117-02

Pellan, L., Dieye, C.A.T., Durand, N., Fontana, A., Strub, C., Schorr-Galindo, S., 2021. Biocontrol Agents: Toolbox for the Screening of Weapons against Mycotoxigenic Fusarium. Journal of Fungi 7, 446. https://doi.org/10.3390/jof7060446

Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., Strub, C., 2020. Commercial Biocontrol Agents Reveal Contrasting Comportments Against Two Mycotoxigenic Fungi in Cereals: *Fusarium Graminearum* and *Fusarium Verticillioides*. Toxins 12, 152. https://doi.org/10.3390/toxins12030152

Pitt, R.E., 1993. A Descriptive Model of Mold Growth and Aflatoxin Formation as Affected by Environmental Conditions. J Food Prot 56, 139–146. https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.2.139

Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G., 2009. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. Food and Chemical Toxicology, Early Awareness of Emerging Risks to Food and Feed Safety 47, 927–931. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.010

Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. J Bacteriol 154, 1222–1226.

Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., Cammue, B.P.A., 2020. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. Biological Control 144, 104240. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240

Reyneri, A., 2006. The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal. Vet Res Commun 30, 87–92. https://doi.org/10.1007/s11259-006-0018-8

Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. J Appl Bacteriol 81, 501–508. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x

Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. Journal of Theoretical Biology 162, 447–463. https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099

Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. International Journal of Food Microbiology 63, 265–273. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00469-4

Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M., 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticilliodes* and *F. proliferatum* on corn. Int J Food Microbiol 105, 35–52. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.007

Sandoval-Contreras, T., Marín, S., Villarruel-López, A., Gschaedler, A., Garrido-Sánchez, L., Ascencio, F., 2017. Growth Modeling of *Aspergillus niger* Strains Isolated from Citrus Fruit as a Function of Temperature on a Synthetic Medium from Lime (Citrus latifolia T.) Pericarp. J Food Prot 80, 1090–1098. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-408

Sutherst, R.W., Constable, F., Finlay, K.J., Harrington, R., Luck, J., Zalucki, M.P., 2011. Adapting to crop pests and pathogen risks under a changing climate. WIREs Climate Change 2, 220–237. https://doi.org/10.1002/wcc.102

Tassou, C.C., Natskoulis, P.I., Magan, N., Panagou, E.Z., 2009. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production boundaries of two *Aspergillus carbonarius* isolates on a simulated grape juice medium. Journal of Applied Microbiology 107, 257–268. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04203.x

Vujanovic, V., Hamel, C., Yergeau, E., St-Arnaud, M., 2006. Biodiversity and biogeography of Fusarium species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. Microb Ecol 51, 242–255. https://doi.org/10.1007/s00248-005-0046-x

Yergeau, E., Sommerville, D.W., Maheux, E., Vujanovic, V., Hamel, C., Whalen, J.K., St-Arnaud, M., 2006. Relationships between Fusarium population structure, soil nutrient status and disease incidence in field-grown asparagus. FEMS Microbiol Ecol 58, 394–403. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00161.x

Yogendrarajah, P., Devlieghere, F., Njumbe Ediage, E., Jacxsens, L., De Meulenaer, B., De Saeger, S., 2015. Toxigenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method. Food Microbiology 52, 185–196. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.016

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. Appl Environ Microbiol 56, 1875–1881.

Appendix

Table 1: a_0, a_1, a_2, a_3, a_4 and a_5: coefficients estimated with the second order polynomial equation using nonlinear regression (First step mycotoxin modeling).

Modalities	Day	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5
G : R2 = 80%	5	-26,910	-125,268	63,845	5,628	-,129	1,620
G : R2 = 96%	7	-42,526	3,143	-7,928	4,266	-,093	,217
G : R2 = 95%	10	-49,486	4,925	-5,284	4,795	-,101	,049
G : R2 = 96%	12	-48,328	-1,411	-2,673	4,949	-,106	,151
GM : R2 = 80%	5	-20,755	-114,789	49,429	4,941	-,118	1,842
GM : R2 = 98%	7	-32,197	-6,613	1,817	3,719	-,083	,144
GM : R2 = 97%	10	-43,708	1,715	1,172	4,399	-,093	-,075
GM : R2 = 96%	12	-39,644	-2,283	1,132	4,267	-,093	,052
GX : R2 = 64%	5	-21,104	-83,899	23,099	4,287	-,104	1,757
GX : R2 = 97%	7	-50,404	9,139	-6,149	4,741	-,098	-,102
GX : R2 = 93%	10	-62,708	11,206	-5,407	5,625	-,113	-,176
GX : R2 = 89%	12	-63,345	69,371	-45,957	4,546	-,090	-,656

Table 2: Estimated $a_{(i)}$ coefficients: $b_{(i)}$ and $c_{(i)}$ coefficients estimated for each $a_{(i)}$ parameters using linear regression (Second step mycotoxin modeling).

linear regression

Confrontation	t (b_0)	cste (c_0)	t (b_1)	cste (c_1)	t (b_2)	cste (c_2)	t (b_3)	cste (c_3)	t (b_4)	cste (c_4)	t (b_5)	Cste (c_5)
G	-2,945	-16,78	15,04	-157,497	-7,891	79,066	-0,055	5,373	0,002	-0,127	-0,186	2,09
GM	-2,875	-9,638	14,009	-149,569	-5,862	63,217	-0,046	4,725	0,003	-0,118	-0,227	2,423
GX	-5,754	-0,647	18,605	-156,688	-8,296	61,912	0,077	4,146	0,001	-0,109	-0,295	2,714

	R^2 (a_0)	R^2 (a_1)	R^2 (a_2)	R^2 (a_3)	R^2 (a_4)	R^2 (a_5)
G	88%	73%	70%	30%	46%	77%
GM	88%	77%	75%	28%	52%	78%
GX	90%	91%	90%	41%	29%	86%

Chapitre III

Impact of temperature variations on biocontrol mechanisms of three commercial BCAs against *Fusarium graminearum*

Ce troisième chapitre fait état des mécanismes impliqués dans la limitation de croissance et des mycotoxines du pathogène par les BCAs sous des conditions abiotiques contrastées. Tout d'abord, un mécanisme de biocontrôle du pathogène au stade précoce de la germination a été étudié afin d'évaluer la capacité des BCAs à inhiber la germination des spores du pathogène sous l'influence d'une température croissante. Dans un deuxième temps, la capacité de ces BCAs à synthétiser des enzymes capables de dégrader la paroi mycélienne du pathogène après le stade de germination a également été évaluée sous l'influence de la température. Dans le cas où le pathogène parvient à passer le stade de la germination et de la croissance, il pourra produire des mycotoxines. Ainsi, les deux dernières étapes de ce chapitre ont consisté à évaluer la capacité des BCAs à dégrader les mycotoxines produites par *F. graminearum* ainsi que leur capacité à interférer avec des gènes de la voie de biosynthèse des mycotoxines à différentes températures.

Impact of temperature variations on biocontrol mechanisms of three commercial BCAs against *Fusarium graminearum*

Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE [1], Noël DURAND [1,2], Sabine SCHORR-GALINDO [1], Caroline STRUB [1], Angélique FONTANA [1]
[1] UMR Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de la Réunion, Montpellier, France
[2] CIRAD, UMR Qualisud, F-34398 Montpellier, France - Qualisud, Univ Montpellier, Univ Avignon, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ de La Réunion, Montpellier, France
Corresponding author: Cheikh Ahmeth Tidiane DIEYE (cheikhatdieye@gmail.com)

Abstract

The use of microorganisms in agriculture as biocontrol agents represents one of the most promising and widespread tools for the sustainable management of plant diseases. However, the efficacy of microbial biological control agents (BCAs) is still inconsistent in field conditions. For this reason, this work studied the influence of temperature variations on biocontrol mechanisms of three commercial BCAs (Mycostop®, Xedavir® and Polyversum®) against a mycotoxigenic strain of *Fusarium graminearum* to investigate how increasing in temperature will modulate the BCAs efficacy. Two temperatures conditions, 25°C and 30°C, respectively, when all BCAs significantly reduced growth and mycotoxin production and when no BCAs significantly reduced it, were selected to evaluate their ability to adapt in variating conditions.

All BCAs showed significant efficacy in controlling pathogen at 25°C but Xedavir was the only BCA which has demonstrated the better ability to adapt with temperature variations, especially its ability to inhibit spore germination of the pathogen. However, increasing in temperature (30°C) has significantly affected the chitinolytic enzymes activities, the ability of DON biotransformation and the inhibition of the expression of *Tri5* and *Tri8* genes (positioned at different levels of mycotoxin synthesis pathways) of all BCAs. These results contributed to a better understanding of the lack of efficacy of BCAs against mycotoxigenic *Fusarium* in field due to environmental factors especially the temperature. It will help pave the way toward an efficient application of the most suitable BCAs for field against *F. graminearum*, to better face the challenges posed by environmental factors in a context of climate change.

Keys words: biocontrol, mechanisms, *F. graminearum*, BCAs, temperature, efficacy

1. Introduction

Wheat is the main cereal staple for 40% of the world's population, and the leading source of human nutrition, ahead of rice and maize (Beauvais *et al.,* 2022). Global food security relies heavily on wheat production. Like all plants, wheat could be attacked by phytopathogenic microorganisms and among these, the *Fusarium* genus is particularly destructive. *Fusarium graminearum* can cause a wheat disease known as Fusarium Head Blight (FHB). This disease is doubly detrimental to wheat cultivation. It affects both yield and grain quality, with the risk of mycotoxin contamination of wheat. Indeed, *Fusarium graminearum* is also known to produce mycotoxins (trichothecenes B and zearalenone). Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by certain fungi. They are considered natural contaminants of a wide range of food products. Several issues revolve around mycotoxigenic plant pathogens, ranging from the need to protect the health of consumers and producers, to the economic challenges of intensive cereal production, and those linked to the environment, such as climate change and limiting impact on biodiversity. Protection is built around agronomic and chemical solutions such as the choice of Fusarium-tolerant varieties and the application of chemical fungicides at the flowering stage. The need to reduce the use of chemical pesticides in agriculture has promoted the development of bio-based strategies of plant protection, exploiting beneficial organisms, and the ecological services they provide (Di Lelio *et al*., 2021).

Biological control is an alternative to pesticides that are increasingly used and distributed worldwide (Nicot, 2011). The use of microorganisms in agriculture as biocontrol agents represents one of the most promising and widespread tools for the sustainable management of plant diseases (Chowdhury *et al.*, 2015; Harman *et al*., 2004; Howell, 2003; Köhl *et al*., 2011; Rahman *et al.*, 2018). However, the efficacy of microbial biological control agents (BCAs) is still largely inconsistent in field conditions (Compant *et al*., 2010; Koirala *et al*., 2023; Wamani *et al*., 2023). One of the major problems associated with the use of BCAs in agriculture is the variability of their efficacy against the targeted organisms, which can generally be attributed to biotic and abiotic factors that can interfere with their protective efficacy. The microclimatic conditions encountered by microorganisms could be considered as key factors in their biocontrol activity. Among these factors, temperature is particularly important and will also have a major impact on agriculture, in the context of global climate change (Elad and Pertot, 2014; Lobell *et al.*, 2011).

Temperature may significantly impact the efficacy of BCAs by modulating their competition capacity with plant pathogenic microorganisms (Pujol *et al.*, 2007; Schmidt *et al*., 2004). It

could affect the production of antibiotics and lytic enzymes involved in BCAs control mechanisms (Landa *et al.*, 2004). Several studies reported that temperature could influence spore germination, hyphal growth, and colonization of BCAs that consequently influences their competitive and antagonistic capabilities against pathogens (Kredics *et al.*, 2003; Mukherjee and Raghu, 1997). Growth and antagonistic activity of BCAs might be affected by an increase in temperature (Compant *et al.*, 2010). Poras *et al.* (2002) investigated the effect of three temperatures (20, 25 and 30°C) on growth and antagonistic ability of *Trichoderma* spp isolated from a commercial product, against *Rhizoctonia solani*. The higher temperature (30°C) had negatively affected the efficacy of the BCA (Porras *et al.*, 2002). Indeed, the selection of appropriate BCAs to combat plant pathogens in agriculture depends not only on the target pathogen, but also on the ecological adaptability of BCAs to various environments, climatic conditions, and crops, which can influence their efficacy in the field. For this reason, this work aimed to study how increasing in temperature will modulate the BCAs efficacy against *Fusarium graminearum*.

Previously, the impact of different temperatures (20°C, 25°C, 30°C and 33°C) and relative humidity (40%, 50%, 60% and 80%) on the growth of three BCAs, on the growth and mycotoxinogenesis of *F. graminearum* and on their interaction was first evaluated (Dieye *et al*., 2023). These temperatures were representative of those encountered in the field during the flowering period which is favorable for attack by the pathogen. Two temperatures conditions were selected with the aim of understanding the reasons for the inefficiency: 25°C, temperature at which all BCAs significantly reduced growth and mycotoxins production and 30°C, temperature at which none of BCAs significantly reduced them.

The aim of this study was to evaluate and identify the potential impact of increasing temperature on the known mechanisms of the BCAs which allow the reduction of growth and mycotoxin production of *F. graminearum*. Firstly, BCAs were confronted against the pathogen at the early germination stage to evaluate their ability to inhibit pathogen spore germination at different temperatures. Once the germination stage has been passed, the ability of these BCAs to synthesize enzymes that can degrade the pathogen cell wall was evaluated according to temperatures. In the cases of spore germination and Fusarium mycelial growth, it is able to produce mycotoxins. Thus, the last two stages of this study were based on assessing the ability of BCAs to degrade the mycotoxins produced by *F. graminearum* and their capacity to interfere with the mycotoxin's biosynthesis pathway at different temperatures.

2. Materiel and Methods

2.1. Micro-organisms and mycotoxin analysis

2.1.1. *Fusarium graminearum*

F. graminearum strain BRFM 1967 was used (CIRM, University of Aix-Marseille, Marseille, France), and chosen for its high capacity to produce mycotoxins. Isolated from a wheat plant, it has a deoxynivalenol/15-acetyldeoxynivalenol/3-acetyldeoxynivalenol (DON/15-AcDON/3-AcDON) chemotype. The strain was maintained on potato dextrose agar (PDA: BD Difco, Sparks, MA, USA) under paraffine oil at 4°C and actively grown on PDA at 25 °C for 7 days for spore production. The spore suspension was prepared from solid medium in sterile water-Tween (0.01%) and filtered with carded cotton.

2.1.2. Commercial biological control agents (BCAs)

Three commercial biological control agents (BCAs) were selected for their contrasting characteristics (Pellan *et al.,* 2020). All strains were isolated from their commercial product with a classical microbial isolation protocol (serial dilution and multiple striation inoculation), on an appropriate medium (supplemented with 0.01% tetracycline for *Pythium oligandrum* only). Strains were actively grown on ISP4, PDA and V8 respectively for *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop®), *Trichoderma asperellum* (Xedavir®) and *Pythium oligandrum* (Polyversum®) at 25°C for 7 days for spore production. For the rest of the study, strains isolated from commercial products were designated using their commercial name: Mycostop® for *S. griseoviridis*, Xedavir® for *T. asperellum*, and Polyversum® for *P. oligandrum*. All BCAs could be used against all cereal's pathogens fungi but only Polyversum® is recommended specially for *F. graminearum* treatment.

2.1.3. Mycotoxin extraction and analysis

Half Petri dish was sampled by cutting along the line formed by the two inoculation points, and finely cut and weighed. 30 mL of acetonitrile/water/acetic acid (79:20:1, v/v/v) were added. Samples (i.e., *F. graminearum* alone or confronted with BCAs) were homogenized by mechanical agitation for 20 minutes at 250 RPM. Then samples were diluted 1:50 in water/acetic acid (99.5:0.5, mobile phase A of analyzer) and filtered with a cellulose acetate filter (0.45 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

Mycotoxin detection and quantification were achieved, as described by Moreau and Levi (2014), using an Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled with a mass spectrometer (8040, Shimadzu, Tokyo, Japan). LC separation was

performed using a Phenomenex Kinetex XB Column C_{18} (50 mm * 2 mm; 2.6 µm particles) at 50 °C, with an injection volume of 50 µL. Mobile phase composition was (A) 0.5% acetic acid in ultra-pure water and (B) 0.5% acetic acid in isopropanol (HPLC MS grade, Sigma, St Louis, MO, USA), and the mobile phase flow rate was 0.4 $mL.min^{-1}$. The mass spectrometer was operated in electrospray positive (ESI+) and negative (ESI-) ionization mode, and two multiple reaction monitoring (MRM) transitions for each analyte were monitored for quantification (Q) and qualification (q). All data were analyzed using LabSolutions Software (v5.91/2017, Shimadzu, Tokyo, Japan, 2017). Limits of detection or quantification (LOD/LOQ in ng mL^{-1}) for each mycotoxin were: DON (5/15), 15-ADON (5/15), Zearalenone (ZEN) (0.5/1.5).

2.2. Impact of temperature variation on BCA mechanisms

2.2.1. On the efficacy of BCAs in reducing *F. graminearum* spores' germination

Spores of Mycostop® and Xedavir® were collected from pure culture on solid medium with sterile water. Spore suspensions were filtered with carded cotton and standardized at 10^5 spores. mL^{-1}. Spore suspension of *F. graminearum* was prepared (10^4 spores. mL^{-1}) in the same way. In microtube, 250 µL of spore suspensions of BCAs were mixed with 250 µL of *F. graminearum* spore suspension and incubated for 36 h at 25°C and 30°C. Microscopic observations and counts of germinated spores were conducted on sample of 10 µL, every 3 h or 6h depending on germination speed of *F. graminearum* with a Zeiss PrimoStar microscope (Boston Industries). For Mycostop and Xedavir spore suspensions, sterile water was used as control. *F. graminearum* spores vs. BCAs spores mixes and controls were conducted in triplicate. For each analyzed time point, 200 spores on average were considered per replicate to calculate the percentage of *F. graminearum* germinated spores (%). Average values were used to create the percentage of *F. graminearum* spore germination graphs.

2.2.2. On chitinase activities of BCAs

In 250 mL Erlenmeyer flasks, 100 mL of minimum liquid medium specific for each BCA was prepared as described in literature: ISP2 liquid for Mycostop® (Shepherd *et al.*, 2010), MSM for Xedavir® (Mallikharjuna Rao *et al.*, 2016) and MMPO for Polyversum® (Al-Rawahi and Hancock, 1997) supplemented or not (Control) with 1% (w/v) of cell wall powder of *F. graminearum* (El-Katatny *et al.*, 2006). Mycostop and Xedavir were inoculated with spore suspensions (5 mL –10^5 spores. mL^{-1}) and Polyversum with 7-days plugs (5 mm in diameter) in Erlenmeyer flasks and incubated at 25°C and 30°C under orbital shaker at 150 RPM (Unitron INFORS, Bottmingen, Suisse) for 10 days. Liquid cultures were centrifugated 5 min at 10000

RPM and the supernatant was used as the crude enzymes extract.

Chitinase activity was assessed using a Chitinase assay kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. The kit provides three substrates: 4-Nitrophenyl N,N'-diacetyl-β-D-chitobioside (exochitinase 1 activity detection: chitobiosidase activity), 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (exochitinase 2 activity detection: β-N-acetylglucosaminidase activity) and 4-Nitrophenyl β-D-N,N',N"-triacetylchitotriose (endochitinase activity detection). The cleavage of these substrates' releases p-nitrophenol which has been quantified at 405 nm by an Enspire Multimode Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). *Trichoderma viride* chitinase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a positive control. Assays were conducted in triplicate.

2.2.3. On BCA biotransformation of *F. graminearum* mycotoxin (DON)

To evaluate the impact of temperature variation on the capacity of BCAs to transform, degrade or fix *F. graminearum* mycotoxin (DON), minimum liquid medium Czapeck Yeast Broth (CYB) (250 mL) was inoculated with 7-days plugs (1 cm in diameter) of *F. graminearum* in Erlenmeyer flasks and incubated for 10 days at 20°C, 25°C and 30°C. Liquid cultures were filtered with polyethersulfone (PES) filter (0.22 µm, Sartorius, Göttingen, Germany) to remove mycelium and spores produced by the pathogen and to sterilize medium enriched with mycotoxin. A volume of 10 mL was sampled to quantify the mycotoxin concentration. In parallel, half Petri dishes of medium without mycotoxin Czapeck Yeast Agar (CYA) were inoculated with Xedavir or *F. graminearum* alone (control of mycotoxin non-degradation by the pathogen) with 5 µL of 10^5 spores. mL^{-1} supension. Polyversum was inoculated with 7-days plugs (5 mm in diameter). Water was used as control. After 3 days, corresponding to the initiation of growth of BCAs, the empty half Petri dishes were completed with enriched mycotoxin medium (CYA with DON content adjusted to 20000 $ng.g^{-1}$ of media, equivalence of 100% of mycotoxin content) and incubated for 10 days at 25°C and 30°C. Samples were analyzed on days 5, 7 and 10 for all modalities. Xedavir and Polyversum had gradually colonized the mycotoxin-enriched part. At the end of experiment, in each half of a Petri dish, the remaining mycotoxins were extracted, quantified, summed, and compared to control plates without microorganisms (mycotoxin content control, 100% of mycotoxin content). The experiment was performed only with DON because ZEN was not produced enough in liquid medium at all tested temperatures (20°C, 25°C and 30°C). The main known degradation products resulting from the microbial transformation of mycotoxins were investigated: DOM-1, 3-epi-DON, and 3-keto-DON (McCormick, 2013; Tian *et al*., 2022; Venkatesh and Keller,

2019).

2.2.4. On capacity of BCAs to impact the mycotoxin biosynthesis genes (*Tri5* and *Tri8*)

2.2.4.1. *In vitro* confrontation and sampling for RNA extraction

The *in vitro* confrontation conditions are described in the previous study (Dieye *et al.,* 2023). Sampling is performed under two contrasting temperature conditions based on the results of the previous study cited above: 25°C and 30°C, respectively, when all BCAs significantly reduced DON and when no BCAs significantly reduced DON.

2.2.4.2. RNA extraction and RT-qPCR essay

A sample of 100 mg of fresh matter of *F. graminearum* mycelium was collected from the area of the colony adjacent to the BCA on day 7 and grinded using GenoGrinder (SpexSamplePrep, NJ, USA) with steel grinding balls. Total RNA was extracted using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany) according to manufacturer's instructions. Amount of RNA extracted was estimated by determining the absorbance at 260 nm, and concentration was standardized at 100 ng.µL^{-1}. For the reverse transcription, RNA was reverse transcribed using SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions (Mudge et al., 2006) and the resulting cDNA was diluted 1:20 with water. Primers used for expression analysis are summarized in Table 1. β-tubulin gene was used as a housekeeping gene because it is involved in basic cellular functions and its expression is constitutive and constant over time (Pinson-Gadais e*t al.,* 2008). qPCR was prepared in 384 wells microplate using pipetting robot with a total volume of 1.5 µL including 0.5 µL cDNA, SYBR GREEN PCR master mix (Applied Biosystems, Scoresby, Vic., Australia), and final concentration of 600 nM of each forward and reverse primer. For each reaction, *Tri5* and *Tri8* cDNA and ß-tubulin cDNA were co-amplified. The real-time PCR was performed using the following parameters: first pre-incubation at 95°C for 3 min, 45 amplification cycles with first denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C for 10 s, extension at 72°C for 10 s. Data was analyzed using the LightCycler® 480 Software, version 4.0 to calculate internal PCR amplification efficiencies and relative gene expression values normalized with β-tubulin.

Table 1: Primer pair characteristics used for relative quantification by RT-qPCR.

Gene	Primer Sequence	Position	Amplicon size (bp)	Sources
Tri5	(F) GATCTGATGACTACCCTCAATTCCTT (R) GCCATAGAGAAGCCCCAACAC	518-544 960-981	416	(Marín *et al.*, 2010)
Tri8	(F) GCTACTTTGGACTCAATTCG (R) CATACTGTACYGCAAGTTCTG	517-537 635-656	98	(Lee *et al.*, 2014)
β-Tubulin	(F) GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC (R) GATTGACCGAAAACGAAGTTG	37-61 264-275	595	(Jiao *et al.*, 2008)

2.3. Data expression and statistical analysis

Statistical data analysis was performed with R Software (3.4.4, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017) with the R Commander graphical interface (Rcmdr). Normality and homogeneity of variances were checked with the Shapiro-Wilk test (with Holm-Bonferroni correction) and Levene's test, respectively. For each microorganism (BCA/pathogen), the effect of temperature or BCAs treatment was tested with a one-way ANOVA and multiple comparisons of means were done with Tukey's HSD pairwise comparison test ($\alpha = 0.05$).

3. Results

3.1. Impact of temperature on BCAs efficacy in reducing *F. graminearum* germination

During germination assay, spores of BCAs were put in contact with spores of the pathogen *F. graminearum* under two temperature conditions. The evolution of coculture was observed to identify the influence of increasing temperature on the capacity of BCAs in reducing, on the earlier stage of pathogen cycle, the spore germination (Figure 1). The direct contact between spores of BCAs and spores of *F. graminearum* at 25°C revealed that the two BCAs reduced the germination of pathogen spores throughout the assay up to 55% and 52% for Mycostop and Xedavir, respectively after 36h. At 30°C, only Xedavir had meaningful influence on spore germination with 50% inhibition rate and this effect was maintained over time. In contrast to Xedavir, Mycostop has lost its ability, at 30°C, and tended to stimulate pathogen spore germination. Comparing the impact of increasing temperature (25°C and 30°C) on the behavior of the two BCAs, it appears that Xedavir retained its ability to reduce *F. graminearum* spore germination, with a gradual time-dependent efficacy at 25°C and constant efficacy at 30°C. For

Mycostop, increasing temperature makes it less effective.

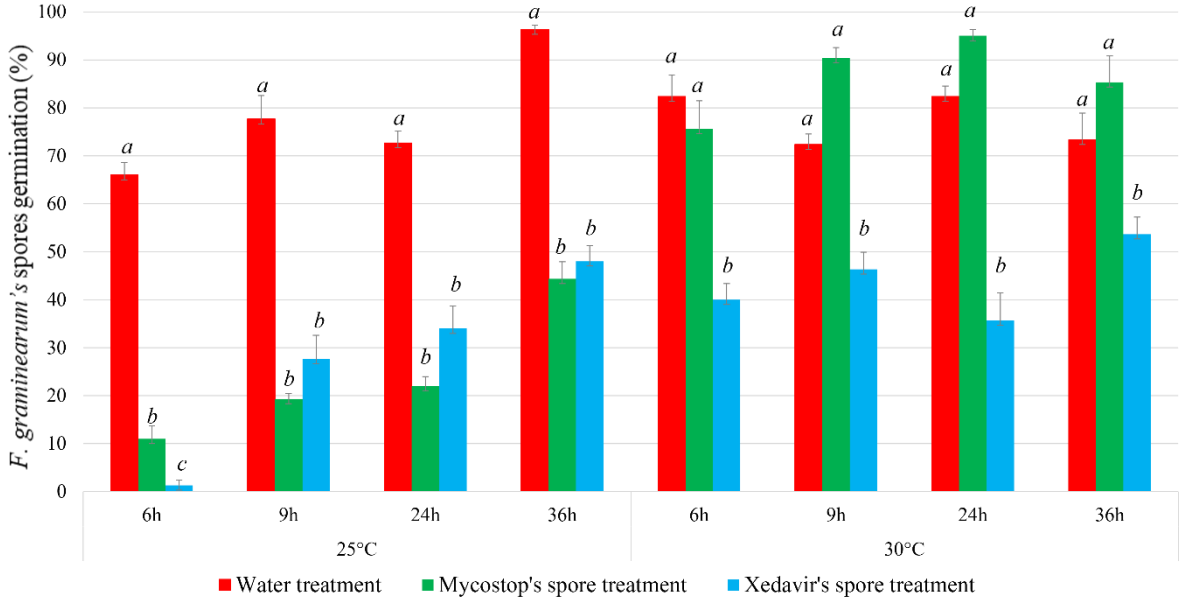


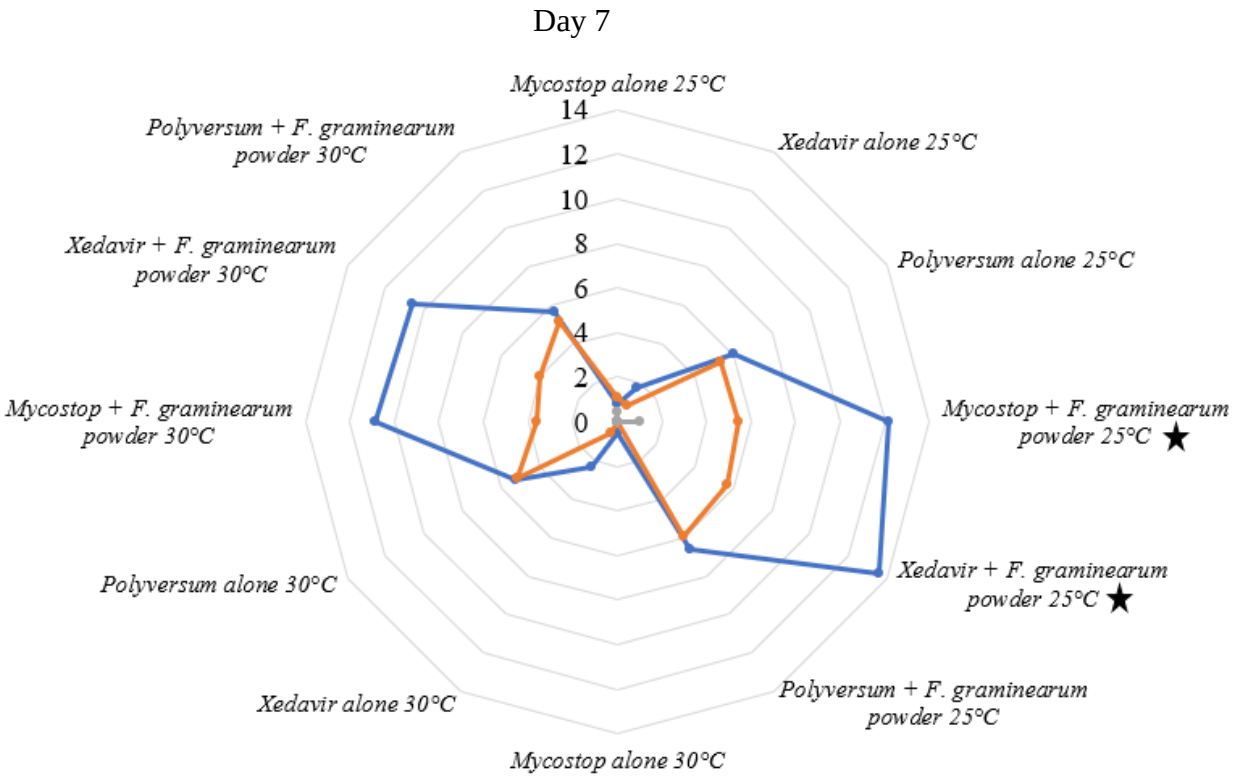
Figure 1: Effect of the increasing temperature (25°C and 30°C) on two BCAs efficacy in reducing *F. graminearum* germination spores. Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis*), Xedavir® (*Trichoderma asperellum*). ANOVA test independent for each competition modality on the germination rate, p-value < 0.05.

3.2. Effect of increase in temperature on BCAs chitinases activities

During the growth phase of microorganisms, the capacity of BCAs to produce enzymes, like chitinases, able to degrade pathogen cell wall was tested under two temperatures (25°C and 30°C). The results revealed how BCAs modulate this activity according to the presence or absence of cell wall powder of *F. graminearum* and how temperature impacts this activity (Figure 2). On day 7, the presence of the powder of *F. graminearum* stimulated the enzyme activities of exochitinase 1 and exochitinase 2 synthesized by Mycostop, with a ≈15-fold and ≈10-fold increase respectively at 25°C and 30°C (Figure 2). Xedavir had a similar profile with a stimulation of exochitinase 1 (≈28-fold and ≈18-fold increase) and exochitinase 2 (≈10-fold and ≈8-fold increase) respectively at 25°C and 30°C. Enzymatic activity of Polyversum did not seem to be affected by temperature and by the presence or absence of *F. graminearum* cell wall powder, but it showed a less ability to produce the two exochitinases compared to Mycostop and Xedavir. Results on day 7 exhibited that increasing temperature had a low effect on the ability of BCAs's chitinolytic activities.

On day 10, the chitinolytic activities of Mycostop were stabilized at around 7 and 20 $mU.mL^{-1}$ for exochitinase 1 and 6 and 14 $mU.mL^{-1}$ for exochitinase 2 when in presence and absence of

pathogen powder respectively at the lowest température. At 30°C, Mycostop synthetized only the exochitinase 1 which was stabilizedi at 10 and 3 $mU.mL^{-1}$ on average in presence and absence of pathogen powder respectively. For Xedavir, enzyme activities blowed up in the presence of *F. graminearum* cell wall powder at 25°C (≈72-fold for exochitinase 2 and ≈49-fold for exochitinase 1). At 30°C, chitinase activities for Xedavir were unchanged from day 7. For Polyversum, it retained approximately the same activity over time at all temperatures and by the presence or absence of *F. graminearum* powder. For the endochitinase, only Mycotop had synthetized it on day 10 at 25°C in presence of *F. graminearum* powder (≈3.5 $mU.mL^{-1}$).



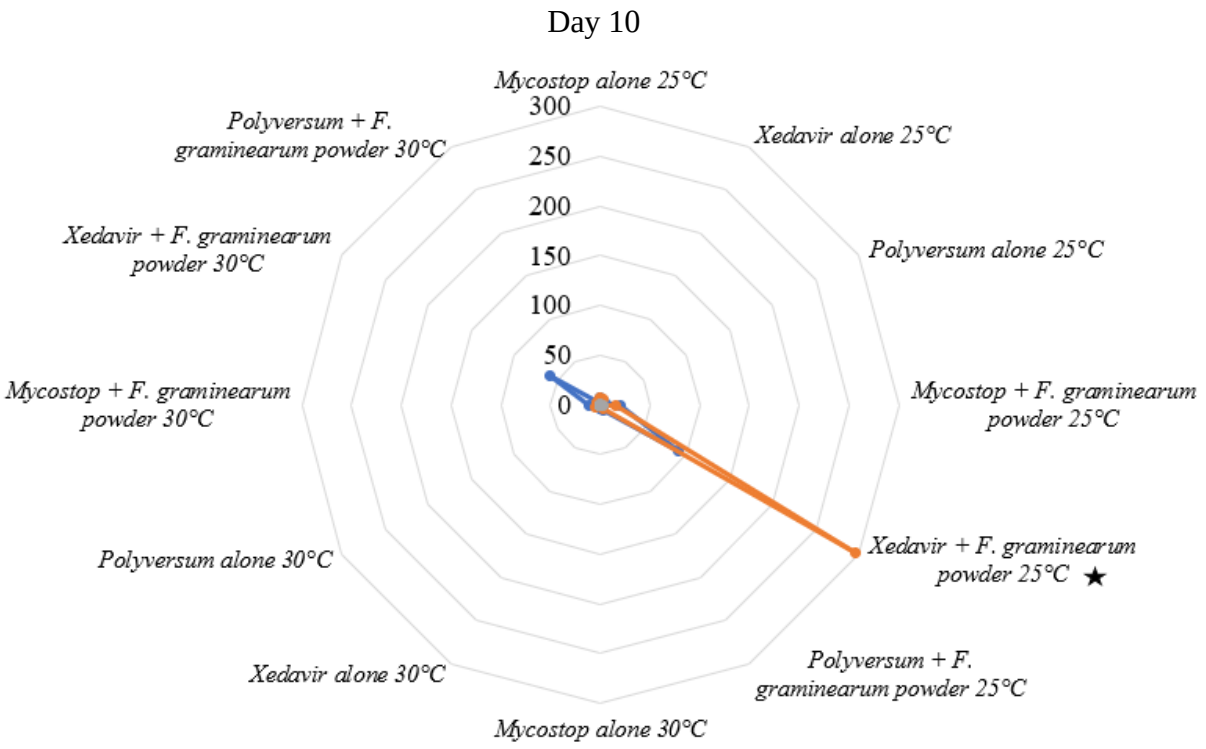


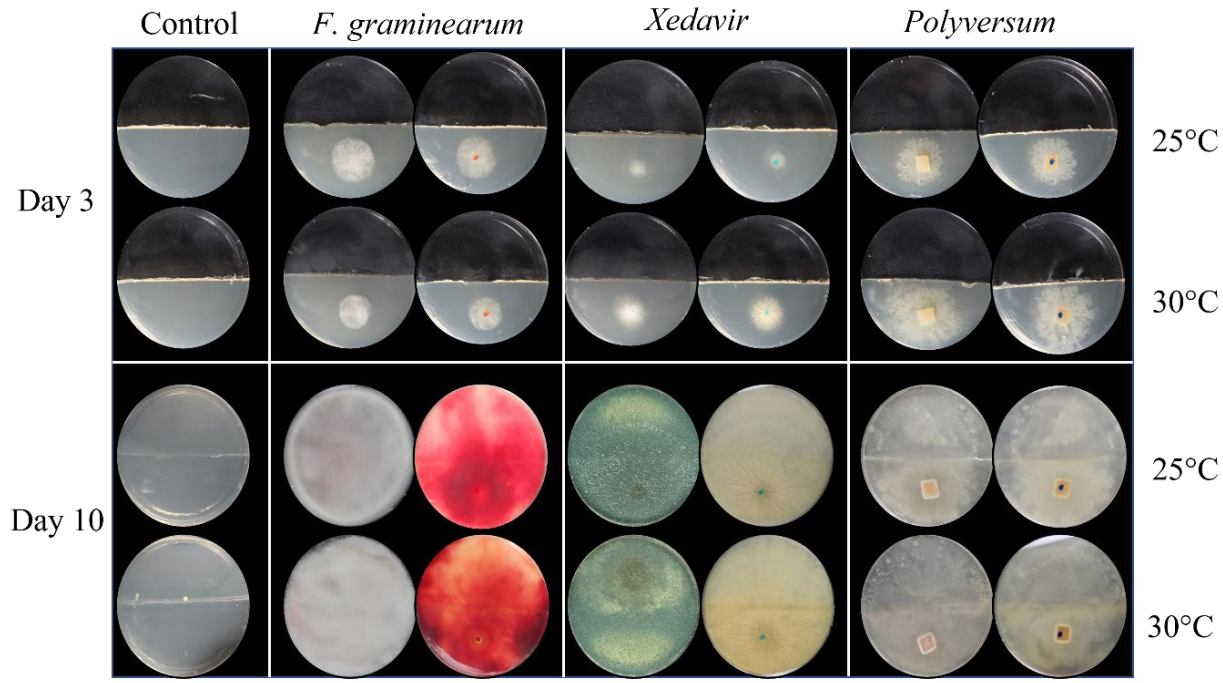
Figure 2: Comparative effect of temperature (25°C and 30°) on BCA chitinase activities in presence or absence on *F. graminearum* powder. The chitinase activity ($mU.mL^{-1}$) of BCAs alone or in contact with mycelium powder of *F. graminearum* was carried out on days 7 and 10. Exochitinase 1: chitobiosidase activity, Exochitinase 2: β-N-acetylglucosaminidase activity and Endochitinase: endochitinase activity. Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis*), Xedavir® (*Trichoderma asperellum*) and Polyversum® (*Pythium oligandrum*). ANOVA test, between BCAs for each chitinase (Exochitinase 1, Exochitinase 2, Endochitinase) and day (day 7 and 10) analyzed independently, p-value < 0.05 (*).

3.3. Temperature effect on biotransformation ability of DON by BCAs

During the confrontation phase (Dieye *et al*., 2023), BCAs have shown their ability to reduce mycotoxin concentrations especially DON specific production, even independently of growth reduction. An experimental device was developed to identify the capacity of BCAs: Xedavir® and Polyversum® to degrade, transform or bind DON produced by *F. graminearum* and how increase in temperature could modulate this biotransformation ability. Mycostop® was not chosen because a previous study highlighted its inability to biotransform mycotoxins due to its slow growth (Pellan *et al*., 2021). In all conditions, the BCAs showed a good ability to colonize and cover the enriched DON medium part of the Petri dish (Figure 3A). After 10 days of growth (Figure 3B) at 25°C, it appeared that Xedavir was the only BCA to act directly on mycotoxin

reduction with almost 70% of mycotoxin degraded or transformed. Polyversum exhibited a 22% reduction, but this effect was not significant. At 30°C, no BCAs significantly reduced mycotoxin (Xedavir 10% and Polyversum 25%). Increasing temperatures could influence the ability of Xedavir to reduce directly the DON produced by *F. graminearum*. In all Petri dishes, a diffusion of mycotoxins from the enriched medium part to the unenriched part was observed at all temperatures. In the condition with the greatest reduction in mycotoxin accumulation, main DON by-products from microbial transformation known in the literature were searched (DOM-1, 3-epi-DON, 3-keto-DON). None of these molecules were detected in all tested days despite the significant reductions over time.

A



B

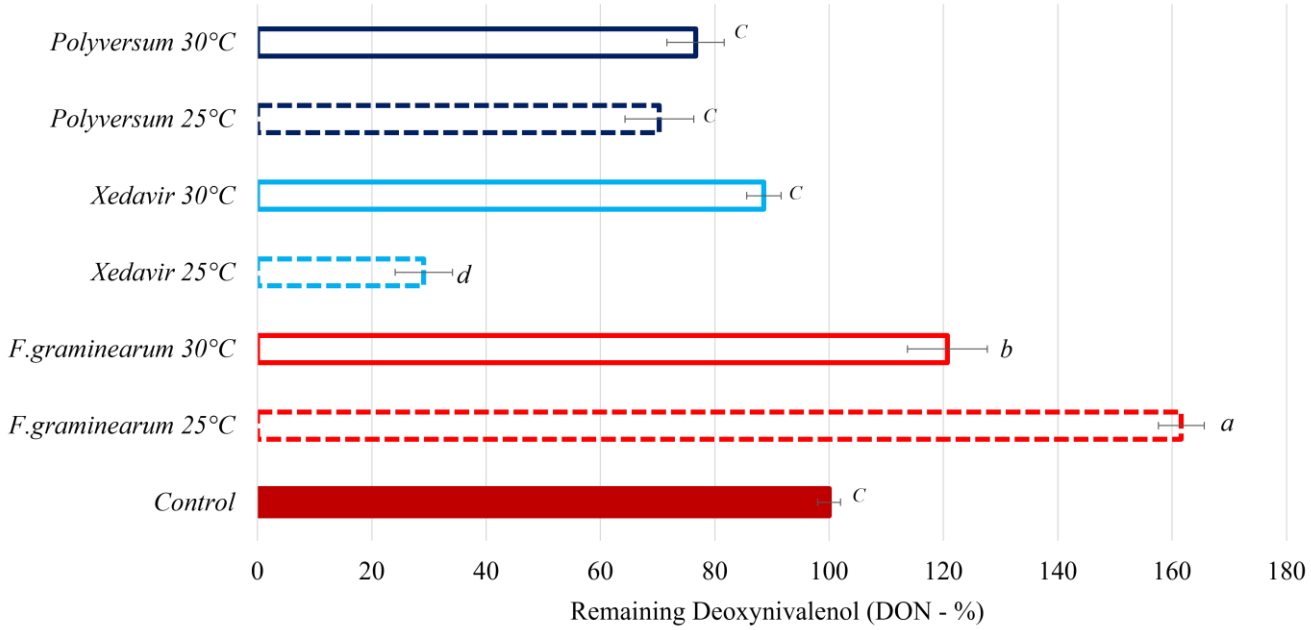


Figure 3: Comparative effect of temperature (25°C and 30°C) on the biotransformation ability of DON by Xedavir and Polyversum. (A) Dispositive and visual aspect of Xedavir and Polyversum colonization during biotransformation test at the beginning (day 3) and the end (day 10). (B) Remaining mycotoxin of *F. graminearum* (DON) in CYA medium (whole dish extraction), 20000 $ng.g^{-1}$ of media = 100%, after 10 days of growth of BCAs at 25°C. Control corresponded to Petri dish without inoculation of microorganisms. Xedavir® (*Trichoderma asperellum*) and Polyversum® (*Pythium oligandrum)*. ANOVA test, p-value < 0.05.

3.4. Impact of temperature on BCAs ability to impact the mycotoxins biosynthesis pathways genes (*Tri5* and *Tri8*) of *F. graminearum.*

The comparative analysis of the effect of temperature on the capacity of BCAs to impact *F. graminearum* trichothecene genes' expression during their interaction was presented in Figure 4. The genes *Tri5* et *Tri8* are involved respectively in the first and last steps of the trichothecene biosynthesis pathways. After 7 days of confrontation, the two genes showed different patterns of expression in the different samples and temperature conditions. A peak was observed in the expression level at 25°C in the control samples for the *Tri5* gene and *Tri8*, underlining the importance of studying expression in different conditions. Two significant different types of inhibition could be observed with a strong inhibition of the expression of the two genes studied by the BCAs at 25°C (75%) and an intermediate inhibition at 30°C (50%). At 25°C, the expression profiles differed according to BCAs effect and compared to the control: Mycostop inhibited 80% and 60% *Tri5* and *Tri8* expression respectively; Xedavir inhibited 60% and 90%

Tri5 and *Tri8* expression respectively and Polyversum, 90% of expression of the two genes. At 30°C, no BCAs significantly impacted the *Tri5* and *Tri8* expression.

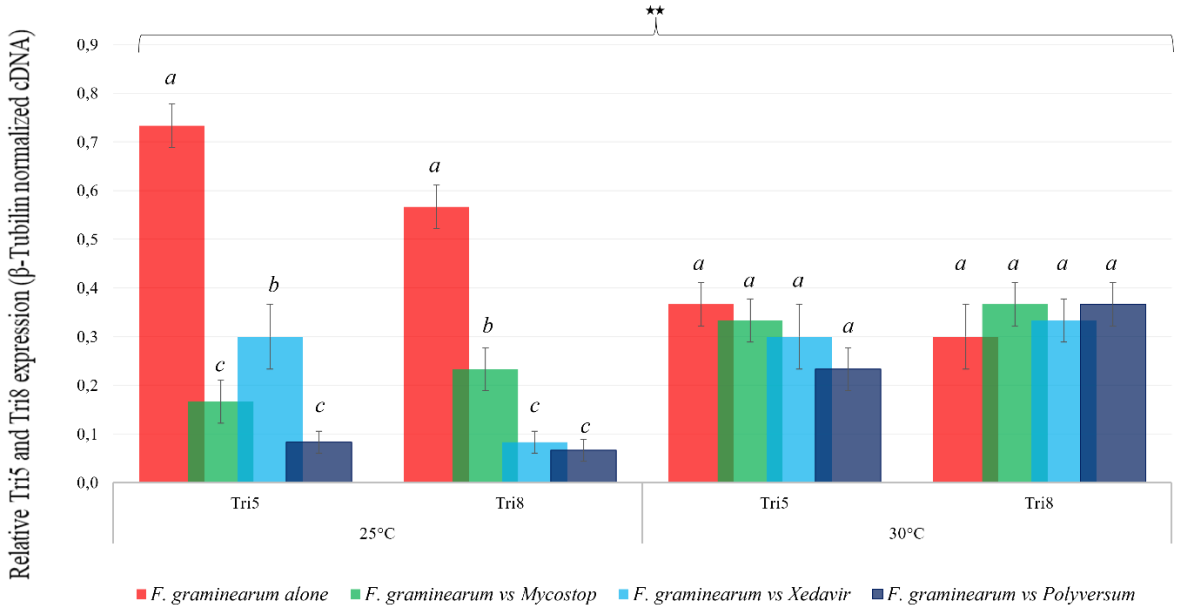


Figure 4: Comparative temperature (25°C and 30°C) and BCAs treatment effects on *F. graminearum* trichothecene gene expression during confrontation assays. Dual culture bioassays of BCAs against pathogen were performed on CYA for 7 days. Genes' expressions of *Tri5* and *Tri8* are expressed in β-Tubulin normalized cDNA relative quantity. Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis*), Xedavir® (*Trichoderma asperellum*) and Polyversum® (*Pythium oligandrum*). ANOVA test independent for each gene was made, p-value < 0.05.

4. Discussion

Several studies on biocontrol by beneficial microorganisms provide a good overview of the different mechanisms that can be deployed by BCAs to prevent or halt the progression of plant pathogens. Biocontrol involves many types of interaction between microorganisms in a complex synergy. In general, studies focus on characterizing the mechanisms that occur in different experimental situations and at different stages of the pathogen's life cycle. Pathogens are frequently impacted by their interactions with other microorganisms in nature. A recent study by Pellan *et al.* (2021) evaluated the different mechanisms of action of three commercial BCAs against two mycotoxinogenic pathogens of the genus *Fusarium* throughout their life cycle (from spore germination to pathogen survival). This present work can be seen as a complementary approach to this study on precise targeted mechanisms involving the influence of an important abiotic factor (temperature) which can modulate BCA-pathogen interaction

mechanisms.

The aim of this study was to evaluate and identify the potential impact of a rising in temperature on the known mechanisms of three commercial biocontrol agents concerning the reduction of growth and mycotoxin production when interacting with the pathogen *F. graminearum.*

In coculture bioassay with pathogen at 25°C, Mycostop and Xedavir were able to inhibit the spore germination of *F. graminearum* over time for up to 36 h. This first contact between BCAs and pathogen takes place as soon as the spores germinate. The inhibition ability of BCAs could be explained by an efficacy synthesis of antimicrobial compounds by the two BCAs in the spore stage. Actinomycetes, and particularly *Streptomyces* species, are well known for their production of a wide spectrum of antibiotics (Igarashi, 2004; Oskay, 2009). Pertot *et al.*, (2015) suggested also that *Streptomyces* species could have other possible mechanisms including the production and excretion of antifungal metabolites (e.g., low molecular weight antifungal compounds or lytic enzymes like chitinase) to attack plant pathogens. Xedavir also had a major impact on the germination of *F. graminearum* spores, and this effect could be related to the synthesis of anti-germinative compounds such as viridin, which has been identified for *Trichoderma spp.* as an inhibitor of spore germination of different pathogens (de las Mercedes Dana *et al.*, 2001). *Trichoderma* spp could synthetize cell-wall-degrading enzymes (CWDEs) like glucanases. It has been shown that β-1,3-glucanases inhibit spore germination or the growth of a broad spectrum of fungal pathogens (i.e., species of *Rhizoctonia, Fusarium, Alternaria, Ustilago, Venturia* and *Colletotrichum*) in synergistic cooperation with chitinases (Elad *et al.*, 2001; Gajera and Vakharia, 2012) and antibiotics (Hermosa *et al.*, 2000; Howell, 2003). Another compound secreted by *Trichoderma asperellum*, the 6-pentyl-α-pyrone (6PP), has shown a high effect on the conidia germination and tube elongation of *F. graminearum* (El-Hasan *et al.*, 2007). *Trichoderma* species could also produce many secondary metabolites, some of them specifically involved in the direct antibiosis like most of the isocyanide derivates, water-soluble compounds, i.e., heptelidic acid or koningic acid or peptaibols, which are linear oligopeptides of 12–22 amino acids rich in α-aminoisobutyric acid, N-acetylated and containing an amino alcohol at the C-terminus (Pertot *et al.*, 2015). These various compounds could explain the persistence of Xedavir's efficacy in inhibiting pathogen spore germination, even with an increase in temperature. Unlike Xedavir, Mycostop has lost its ability to inhibit pathogen spores with increasing temperature. Several studies have been carried out on the possible impact of climate change (which supposed an increase in temperature) on the behavior of microorganisms. Changing abiotic conditions are expected to affect microbial communities in the soil and canopy pathosystems, possibly altering the currently observed beneficial effects

of these communities (Bonaterra *et al*., 2022; Boro *et al*., 2022; Elad *et al*., 2001; Fazeli-Nasab *et al*., 2022; Haelewaters *et al*., 2022). Most microorganisms that produce antifungal compounds also could synthesize lytic enzymes (Wang *et al*., 2013).

BCAs, in contact with pathogens, could synthesize compounds that degrade the fungal cell wall, like chitinases, preventing the progression of pathogens. Numerous studies have shown this ability in different species of *Trichoderma* (Bader Ul Ain *et al*., 2019; Wang *et al*., 2013). = Mycostop and Xedavir have exhibited their capacity to synthesize these enzymes in the presence of pathogen cell wall powder. Several actinomycete species, specially *Streptomyces spp.,* produced chitinases involved in antagonistic activities, and several species have been studied for their chitinase production (Blaak and Schrempf, 1995; Gangwar *et al.*, 2016; Tsujibo *et al.*, 2000; Umar *et al.*, 2021). *S. violasceusniger* showed antifungal activity against *Phanerochaete chrysosporium* on solid medium, and the antifungal activity was still present after recovery of supernatant from a *S. violasceusniger* culture in the presence of chitin and testing of this supernatant on the fungus. An endochitinase was found to be the source of the observed antifungal activity (Shtark *et al.,* 2003). A chitinase produced by *S. aureofaciens* showed antifungal activity against *Colletotrichum musae* and *F. oxysporum*, with inhibition of *F. oxysporum* spore germination and hyphal growth (Taechowisan *et al.,* 2003). One of the chitinases produced by *S. coelicolor* significantly inhibited the mycelial growth of *T. reesei*, *T. viride*, *Mucor javanicus* and *F. solani,* and slightly that of *A. niger*, *F. oxysporum* and *B. cinerea* (Kawase *et al*., 2006).

Genomes of some mycoparasitic *Trichoderma spp.* are rich in gene-encoding enzymes like chitinases and glucanases (Druzhinina *et al.,* 2011; Kubicek *et al*., 2011). CWDEs from different *Trichoderma* strains showed antifungal activity towards a broad spectrum of fungal pathogens, including *Fusarium* species (Pertot *et al.,* 2015). This production of lytic enzymes and antibiotic metabolites may greatly vary among strains. Each strain shows specific characteristics which could help their adaptation to the environmental condition variation. The chitinolytic activity of *Trichoderma* comprises many enzymes whose list has rapidly become updated as enzymes and genes are reported (Benítez *et al.,* 2004). Chitinases are divided into 1,4-β-acetylglucosaminidases (GlcNAcases), endochitinases and exochitinases. The pattern of induction differs from one *Trichoderma* strain to another. It is believed that fungi secrete exochitinases constitutively at low levels. When chitinases degrade fungal cell walls, they release oligomers that induce exochitinases, and attack begins (Benítez *et al.,* 2004). The GlcNAcases CHIT73 and CHIT102 have been detected in *T. harzianum* TM and *Trichoderma asperellum*, and CHIT102 triggers the expression of other chitinolytic enzymes (Haran, 1996).

In this study, Xedavir showed no endochitinases activity. The role of endochitinases is to cleave chitin chains in random locations and generate low molecular weight oligomers. The two exochitinases studied and synthetized by Xedavir and Mycostop at 25°C were chitobiosidases which catalyze progressive release of diacetylchitobiose from terminal nonreducing end and N-acetylglucosaminidases which cleaves oligomeric products obtained by endochitinases into monomers of N-acetyl glucosamine, respectively (Swiontek Brzezinska *et al*., 2014). In quantifying the chitinolytic activities of Xedavir at 25°C after 10 days, exochitinases were massively detected, but not endochitinases, unlike other species of *Trichoderma* able to produce N-acetylglucosaminidases, endochitinases, and chitobiosidases (Haran *et al*., 1995). This could be explained by the coculture conditions but also it may be related to the repression of this chitinase genes by the presence of *F. graminearum* and DON, as described for the BCA *Trichoderma atroviride* (Lutz *et al.*, 2003).

Despite all the weapons used by the BCAs, the pathogen can succeed in producing its mycotoxins. In this situation, the BCAs could deploy other mechanisms to degrade these mycotoxins.

Results showed that the percentage of biotransformation of mycotoxin by Xedavir was important at 25°C after 10 days (70% reduction) compared to its ability at 30°C (10%).

Kluger *et al.* (2015) characterized by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) a total of nine different biotransformation products of DON formed during detoxification of the toxin (Kluger *et al.*, 2015). It was detected that DON was conjugated to endogenous metabolites via two major metabolism routes, namely glucosylation (DON-3-glucoside, DON-di-hexoside, 15-acetylDON-3-glucoside, DON-malonylglucoside) and glutathione conjugation (DON-S-glutathione, "DON-2H"-S-glutathione, DON-S-cysteinyl-glycine, and DONS-cysteine). Furthermore, conjugation of DON to a putative sugar alcohol (hexitol) was found (Kluger *et al.*, 2015). In another study, a glycosylated form of DON was also detected in a co-culture of *F. culmorum* and *Trichoderma*, whereas it was absent in cultures of the pathogen alone, thus suggesting that *Trichoderma* could be able to glycosylate DON (Modrzewska *et al*., 2022). Recent studies have proven that *Trichoderma* fungi are not only capable of displaying antagonistic properties towards fungal pathogens but can also inhibit the biosynthesis of mycotoxins (Tian *et al.*, 2022). The enzymes secreted by *Trichoderma* may promote mycotoxin degradation or biotransformation (Dini *et al.*, 2022) and these modifications involving fungal enzymes can lead to the formation of new compounds with varying in toxicity compared to their basic analogues (Tian *et al*., 2020). Pellan *et al.* (2021) suggested that the biotransformation of mycotoxin by Xedavir was an important contributor to

global reduction of mycotoxin during *in vitro* assays (Pellan e*t al.*, 2021). A similar result was confirmed in this study with a significant reduction of DON by Xedavir at 25°C. Tian *et al.* (2016) showed that *T. harzianum*, *T. atroviride*, and *T. asperellum* strains contributed to the inhibition of DON biosynthesis and its biotransformation to DON-3G in contact with *F. graminearum* but this ability was not demonstrated in this study. Presumably, this could be due to the low levels of DON biotransformation products in the co-culture media compared with DON levels. Also, DON could be quickly transformed into by-compounds and then into simpler molecules before analysis, or DON could be transformed into new molecules non identified yet from other mechanisms of biotransformation.

Faced with *F. graminearum*, BCAs could act directly on the specific mycotoxinogenesis independently of growth reduction. At 25°C, the expression profiles of *Tri5* and *Tri8* genes (involved respectively in the first and last steps of the trichothecenes biosynthesis) were significantly affected by the 3 BCAs (Mycostop inhibited 80% and 60% of *Tri5* and *Tri8* expression respectively; Xedavir: 60% and 90% of *Tri5* and *Tri8*, and Polyversum: 90% of the two genes). It also appears that increasing temperature (30°C) has reduced the expression levels of the two genes and negatively impacted the BCAs efficacy. Pellan (2020) has demonstrated that Xedavir and Polyversum were able to inhibit the peak production of 15-ADON produced by a *F. graminearum* strain which was a precursor to the formation of DON, suggesting that this inhibition could be an action of BCAs on the biosynthesis pathway, especially the *Tri8* gene involved in the transformation of 15-ADON into DON. This agrees with the results of this study. Indeed, at 25°C, *Tri8* gene was mainly expressed in control while it was almost absent in samples treated with Xedavir and Polyversum, which appear to act mainly on the late stages of the trichothecene biosynthetic pathways. The modulation of these genes expression by biotic factors has already been evaluated in the case of bacterial interactions, including *Streptomyces* species, and the authors showed the ability of these bacteria to alter histone acetylation and thus block DON synthesis (Chen *et al.*, 2018). In this study, the *Streptomyces* Mycostop had shown that it could modulate the expression level of the two genes when it faces *F. graminearum* in optimal temperature (25°).

Polyversum exhibited the strongest impact on gene expression compared with the two other BCAs. This supports the hypothesis of Pellan (2020), suggesting that Polyversum could have upstream effects of mycotoxin production. Indeed, during dual culture assays, Polyversum caused a strong overall reduction of mycotoxins compared to Mycostop and Xedavir, but it had a low biotransformation capacity for DON and could not inhibit spore germination. In contrast, Xedavir could cause a strong overall reduction of mycotoxins, was able to transform

mycotoxins and synthetize chitinolytic enzymes and had an upstream effect on mycotoxin expression. It appears to be more adaptive in controlling mycotoxins throughout the pathogen development process, but also with temperature variations.

Conclusion

In this study, the selected BCAs showed significant efficacy in controlling pathogen at 25°C. Xedavir has demonstrated the better ability to adapt with temperature variations, especially concerning spore germination inhibition. But, increasing in temperature to 30°C has significantly affected the chitinolytic enzyme activities, the ability of DON biotransformation and the inhibition of the expression of *Tri5* and *Tri8* genes of all BCAs. These results contributed to a better understanding of the lack of efficacy of BCAs against mycotoxigenic *Fusarium* in field due to environmental factors especially the temperature. Understanding the impact of temperature should help guide future product development and recommendations for their optimal application in the field. The results will also allow a step towards an efficient application of the most appropriate BCAs against *F. graminearum*, to better face the challenges posed by the parameters of environmental factors.

References

Al-Rawahi, A.K., Hancock, J.G., 1997. Rhizosphere Competence of *Pythium oligandrum*. Phytopathology® 87, 951–959. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.951

Bader Ul Ain, H., Saeed, F., Asif Khan, M., Niaz, B., Tufail, T., Anjum, F.M., Hussain, S., Rohi, M., 2019. Isolation and characterization of cereal cell walls. International Journal of Food Properties 22, 130–137. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1573832

Beauvais, F., Cantat, O., Le Gouée, P., Madeline, P., Brunel-Muguet, S., Boulonne, L., Gaillard, H., Jolivet, C., Bataille, M.-P., Medjkane, M., 2022. Changement climatique et culture du blé tendre d'hiver en France aux horizons 2070 et 2100 : étude phénoclimatique et géographique à partir des données issues du modèle ALADIN-Climat. cybergeo. https://doi.org/10.4000/cybergeo.39679

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Mecanismos de biocontrol de cepas de *Trichoderma*. International Microbiology 7, 249–260.

Blaak, H., Schrempf, H., 1995. Binding and Substrate Specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* Chitinase in Comparison with Its Proteolytically Processed Form. European Journal of Biochemistry 229, 132–139. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0132l.x

Boedi, S., Berger, H., Sieber, C., Münsterkötter, M., Maloku, I., Warth, B., Sulyok, M., Lemmens, M., Schuhmacher, R., Güldener, U., Strauss, J., 2016. Comparison of *Fusarium graminearum* Transcriptomes on Living or Dead Wheat Differentiates Substrate-Responsive and Defense-Responsive Genes. Front Microbiol 7, 1113. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01113

Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., Montesinos, E., 2022. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. Microorganisms 10, 1759. https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759

Boro, M., Sannyasi, S., Chettri, D., Verma, A.K., 2022. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. Arch Microbiol 204, 666. https://doi.org/10.1007/s00203-022-03279-w

Chen, Y., Wang, J., Yang, N., Wen, Z., Sun, X., Chai, Y., Ma, Z., 2018. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. Nat Commun 9, 3429. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05683-7

Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., Borriss, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. Frontiers in Microbiology 6.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry 42, 669–678. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024

de las Mercedes Dana, M., Limón, M.C., Mejías, R., Mach, R.L., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A., Kubicek, C.P., 2001. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum.* Curr Genet 38, 335–342. https://doi.org/10.1007/s002940000169

Di Lelio, I., Coppola, M., Comite, E., Molisso, D., Lorito, M., Woo, S.L., Pennacchio, F., Rao, R., Digilio, M.C., 2021. Temperature Differentially Influences the Capacity of *Trichoderma* Species to Induce Plant Defense Responses in Tomato Against Insect Pests. Frontiers in Plant Science 12.

Dini, I., Alborino, V., Lanzuise, S., Lombardi, N., Marra, R., Balestrieri, A., Ritieni, A., Woo, S.L., Vinale, F., 2022. *Trichoderma* Enzymes for Degradation of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. Molecules 27, 3959. https://doi.org/10.3390/molecules27123959

Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat Rev Microbiol 9, 749–759. https://doi.org/10.1038/nrmicro2637

Elad, Y., Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (Eds.), 2001. Biocontrol agents: mode of action and interaction with other means of control: proceedings of the 6. W[orking] G[roup] meeting at Sevilla, Spain, November 30 - December 3, 2000, IOBC wprs bulletin. INRA / Centre de Recherches, Dijon.

Elad, Y., Pertot, I., 2014. Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases. Journal of Crop Improvement 28, 99–139. https://doi.org/10.1080/15427528.2014.865412

El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J., Buchenauer, H., 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. J Plant Dis Prot 114, 62–68. https://doi.org/10.1007/BF03356205

El-Katatny, M.H., Abdelzaher, H.M.A., Shoulkamy, M.A., 2006. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi *(Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum var. ultimum*). Archives of Phytopathology and Plant Protection 39, 289–301. https://doi.org/10.1080/03235400500222396

Fazeli-Nasab, B., Shahraki-Mojahed, L., Piri, R., Sobhanizadeh, A., 2022. 20 - *Trichoderma*: Improving growth and tolerance to biotic and abiotic stresses in plants, in: Soni, R., Suyal, D.C., Yadav, A.N., Goel, R. (Eds.), Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy, Developments in Applied Microbiology and Biotechnology. Academic Press, pp. 525–564. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91595-3.00004-5

Gajera, H.P., Vakharia, D.N., 2012. Production of Lytic Enzymes by *Trichoderma* Isolates during in vitro Antagonism with Aspergillus Niger, The Causal Agent of Collar ROT of Peanut. Braz J Microbiol 43, 43–52. https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100005

Gangwar, M., Singh, V., Pandey, A.K., Tripathi, C.K.M., Mishra, B.N., 2016. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces violascens* NRRL B2700. Indian J Exp Biol 54, 64–71.

Haelewaters, D., Hiller, T., Ceryngier, P., Eschen, R., Gorczak, M., Houston, M.L., Kisło, K., Knapp, M., Landeka, N., Pfliegler, W.P., Zach, P., Aime, M.C., Nedvěd, O., 2022. Do Biotic and Abiotic Factors Influence the Prevalence of a Common Parasite of the Invasive Alien Ladybird Harmonia axyridis? Frontiers in Ecology and Evolution 10.

Haran, S., 1996. Differential Expression of *Trichoderma harzianum* Chitinases During Mycoparasitism. Phytopathology 86, 980. https://doi.org/10.1094/Phyto-86-980

Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I., 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycological Research 99, 441–446. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80642-4

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2, 43–56. https://doi.org/10.1038/nrmicro797

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I., 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. Appl Environ Microbiol 66, 1890–1898.

Howell, C.R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Disease 87, 4–10. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4

Igarashi, Y., 2004. Screening of Novel Bioactive Compounds from Plant-Associated *Actinomycetes.* Actinomycetologica 18, 63–66. https://doi.org/10.3209/saj.18_63

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, 212–219. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01235.x

Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Watanabe, T., 2006. Comparison of Enzymatic and Antifungal Properties between Family 18 and 19 Chitinases from S. coelicolor A3(2). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 70, 988–998. https://doi.org/10.1271/bbb.70.988

Kluger, B., Bueschl, C., Lemmens, M., Michlmayr, H., Malachova, A., Koutnik, A., Maloku, I., Berthiller, F., Adam, G., Krska, R., Schuhmacher, R., 2015. Biotransformation of the Mycotoxin Deoxynivalenol in *Fusarium* Resistant and Susceptible Near Isogenic Wheat Lines. PLoS One 10, e0119656. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119656

Koirala, S., Myers, B., Shin, G.Y., Gitaitis, R., Kvitko, B., Dutta, B., 2023. Evaluating options to increase the efficacy of biocontrol agents for the management of *Pantoea* spp. under field conditions. Plant Disease. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2710-RE

Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., Blum, B., 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. Biological Control 57, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.12.004

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E., 2003. Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential.

Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L.D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M.G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Coulpier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebbole, D.J., Esquivel-Naranjo, E.U., Fekete, E., Flipphi, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E.Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kosti, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P.S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E.E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J.A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H.H., Zhang, M., Coutinho, P.M., Kenerley, C.M., Monte, E., Baker, S.E., Grigoriev, I.V., 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. Genome Biology 12, R40. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40

Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., 2004. Influence of temperature on plant–rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of fusarium wilt of chickpea. Plant Pathology 53, 341–352. https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01008.x

Lee, T., Lee, S.-H., Shin, J.Y., Kim, H.-K., Yun, S.-H., Kim, H.-Y., Lee, S., Ryu, J.-G., 2014. Comparison of Trichothecene Biosynthetic Gene Expression between *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum.* Plant Pathol J 30, 33–42. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2013.0107

Lobell, D.B., Schlenker, W., Costa-Roberts, J., 2011. Climate Trends and Global Crop Production Since 1980. Science 333, 616–620. https://doi.org/10.1126/science.1204531

Lutz, M.P., Feichtinger, G., Défago, G., Duffy, B., 2003. Mycotoxigenic *Fusarium* and Deoxynivalenol Production Repress Chitinase Gene Expression in the Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* P1. Applied and Environmental Microbiology 69, 3077–3084. https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3077-3084.2003

Mallikharjuna Rao, K.L.N., Siva Raju, K., Ravisankar, H., 2016. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. Brazilian Journal of Microbiology 47, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.007

Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2010. Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. Int J Food Microbiol 140, 169–174. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.041

McCormick, S.P., 2013. Microbial Detoxification of Mycotoxins. J Chem Ecol 39, 907–918. https://doi.org/10.1007/s10886-013-0321-0

Modrzewska, M., Błaszczyk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T., Bryła, M., 2022. *Trichoderma* versus *Fusarium* - Inhibition of Pathogen Growth and Mycotoxin Biosynthesis. Molecules 27, 8146. https://doi.org/10.3390/molecules27238146

Moreau, S., Levi, M., 2014. Highly sensitive and rapid simultaneous method for 45 mycotoxins in baby food samples by HPLC-MS/MS using fast polarity switching (POCON1480E). Am Soc Mass Spectrom. First Edition. June 1.

Mudge, A.M., Dill-Macky, R., Dong, Y., Gardiner, D.M., White, R.G., Manners, J.M., 2006. A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonization during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and F*usarium pseudograminearum.* Physiological and Molecular Plant Pathology 69, 73–85. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.01.003

Mukherjee, P.K., Raghu, K., 1997. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of shape *Trichoderma sp*. on *Sclerotium rolfsii*. Mycopathologia 139, 151–155. https://doi.org/10.1023/A:1006868009184

Nicot, P.C., 2011. Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors influencing their success. IOBC - International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants.

Oskay, M., 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. AJB 8, 3007–3017. https://doi.org/10.5897/AJB09.527

Pellan, L., n.d. Décryptage des mécanismes impliqués dans le biocontrôle des champignons mycotoxinogènes des céréales. Doctorate thesis, University of Montpellier, 2020.

Pellan, L., Dieye, C.A.T., Durand, N., Fontana, A., Strub, C., Schorr-Galindo, S., 2021. Biocontrol Agents: Toolbox for the Screening of Weapons against Mycotoxigenic *Fusarium*. JoF 7, 446. https://doi.org/10.3390/jof7060446

Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., Strub, C., 2020. Commercial Biocontrol Agents Reveal Contrasting Comportments Against Two Mycotoxigenic Fungi in Cereals: *Fusarium Graminearum* and *Fusarium Verticillioides*. Toxins 12, 152. https://doi.org/10.3390/toxins12030152

Pertot, I., Alabouvette, C., Esteve, E.H., n.d. Mini-paper – The use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases, 2015.

Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Frasse, P., Barreau, C., Cahagnier, B., Richard-Molard, D., Bakan, B., 2008. Magnesium represses trichothecene biosynthesis and modulates Tri5, Tri6, and Tri12 genes expression in *Fusarium graminearum*. Mycopathologia 165, 51–59. https://doi.org/10.1007/s11046-007-9076-x

Porras, M., Barrau, C., Santos, B., Arroyo, F.T., Blanco, C., Romero, F., 2002. Effects of temperature on in vitro response of *Trichoderma* strains against strawberry pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn. Plant Prot. Sci. 38, 620–622. https://doi.org/10.17221/10572-PPS

Pujol, M., Badosa, E., Montesinos, E., 2007. Epiphytic fitness of a biological control agent of fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. FEMS Microbiol Ecol 59, 186–193. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00227.x

Schmidt, M.H., Thewes, U., Thies, C., Tscharntke, T., 2004. Aphid suppression by natural enemies in mulched cereals. Entomologia Experimentalis et Applicata 113, 87–93. https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00205.x

Shepherd, M.D., Kharel, M.K., Bosserman, M.A., Rohr, J., 2010. Laboratory Maintenance of *Streptomyces* Species. Current Protocols in Microbiology 18, 10E.1.1-10E.1.8. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e01s18

Shtark, O.I., Shaposhnikov, A.I., Kravchenko, L.V., 2003. The production of antifungal metabolites by Pseudomonas chlororaphis grown on different nutrient sources]. Mikrobiologiia 72, 645–650.

Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A., Walczak, M., 2014. Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. Curr Microbiol 68, 71–81. https://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4

Syed Ab Rahman, S.F., Singh, E., Pieterse, C.M.J., Schenk, P.M., 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. Plant Sci 267, 102–111. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012

Taechowisan, T., Peberdy, J., Lumyong, S., 2003. Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. Annals of Microbiology.

Tian, Y., Yu, D., Liu, N., Tang, Y., Yan, Z., Wu, A., 2020. Confrontation assays and mycotoxin treatment reveal antagonistic activities of *Trichoderma* and the fate of *Fusarium* mycotoxins in microbial interaction. Environmental Pollution 267, 115559. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115559

Tian, Y., Zhang, D., Cai, P., Lin, H., Ying, H., Hu, Q.-N., Wu, A., 2022. Elimination of *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) via microbial and enzymatic strategies: Status and future perspectives. Trends in Food Science & Technology 124, 96–107. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.002

Tsujibo, H., Okamoto, T., Hatano, N., Miyamoto, K., Watanabe, T., Mitsutomi, M., Inamori, Y., 2000. Family 19 chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: molecular cloning and characterization. Biosci Biotechnol Biochem 64, 2445–2453. https://doi.org/10.1271/bbb.64.2445

Venkatesh, N., Keller, N.P., 2019. Mycotoxins in Conversation with Bacteria and Fungi. Frontiers in Microbiology 10.

Wamani, A.O., Muthomi, J.W., Mutitu, E., Waceke, W.J., 2023. Efficacy of microbial antagonists in the management of bacterial wilt of field-grown tomato. Journal of Natural Pesticide Research 6, 100051. https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100051

Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M., Wang, Y., Huang, Y., Cui, H., 2013. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. FEMS Microbiol Lett 341, 45–51. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12088

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les maladies des cultures affectent le rendement et la qualité des récoltes et entraînent des pertes significatives de la production alimentaire mondiale totale. Avec l'augmentation constante de la population mondiale et la diminution des ressources en terre et en eau, il est nécessaire non seulement de produire plus de nourriture, mais aussi de réduire les émissions de gaz à effet de serre issus des productions agricoles afin d'atténuer le changement climatique et la perte de biodiversité. Actuellement, un défi majeur réside dans la gestion intégrée des cultures en recourant moins aux intrants synthétiques pour la fertilisation et la protection des cultures pour réduire les pertes de rendements dues aux ravageurs et aux agents pathogènes et garantir la sécurité alimentaire. Cette dernière est confrontée aux menaces conjointes causées par l'augmentation de la population mondiale, la multiplication des phénomènes météorologiques extrêmes liés au changement climatique et les risques d'augmentation des épidémies de maladies des cultures. Le climat constitue un moteur important de la dynamique des populations microbiennes. L'augmentation des températures peut considérablement affecter la croissance et le développement des cultures, réduisant les rendements des principales cultures vivrières notamment les céréales. Elle peut également être à l'origine de la modification de la distribution des agents pathogènes et leurs schémas d'infection, rendant les épidémies de maladies des cultures plus graves et moins prévisibles. En Europe, par exemple, une augmentation des températures est attendue avec des événements météorologiques extrêmes plus graves comme les gelées de fin de printemps, les sécheresses estivales, l'augmentation de la vitesse des vents… Il est également attendu une diminution des pluies en Europe du Sud pouvant nécessiter davantage le recours à l'irrigation en agriculture, ce qui n'est pas sans conséquences sur l'émergence des pathogènes des cultures car elle favorise l'humidité. Les cultures futures et leurs pathogènes associés devront s'adapter à ces environnements plus chauds et plus secs. Cependant, malgré les effets prédictifs du changement climatique sur les baisses de rendements des cultures dues aux pathogènes, il existe une volonté manifeste de réduire l'utilisation des intrants chimiques dans le cadre de la transition écologique.

L'augmentation des températures hivernales pourrait avoir un double effet : prolongement de la saison des culture et amélioration de la survie hivernale des agents pathogènes, pouvant entraîner l'apparition précoce d'épidémies. Il est également attendu à une extension de la distribution des agents pathogènes à des latitudes plus élevées. Un environnement plus chaud peut également être favorable à l'émergence de nouveaux agents pathogènes. L'augmentation des températures au printemps et en été pourrait conduire les agents pathogènes à évoluer pour survivre à des températures plus élevées.

Dans ce contexte, il est nécessaire, pour une meilleure gestion des pathogènes, de déterminer les meilleures stratégies de gestion dans diverses conditions environnementales des cultures afin de maximiser leur protection pour faire face aux compromis entre le changement climatique et la sécurité alimentaire. Il est donc important d'étudier l'impact des facteurs abiotiques liés au changement climatique (en particulier l'augmentation de la température et la variation de l'humidité relative) sur les microorganismes pathogènes des céréales tel que *Fusarium graminearum,* et leurs agents de biocontrôle (BCAs).

Cette étude a été consacrée à étudier les effets interactifs des variations des facteurs abiotiques avec des facteurs biotiques, dont des microorganismes antagonistes, et ainsi à identifier les conditions optimales de température et d'humidité relative pour l'efficacité de ces microorganismes contre *F. graminearum.* A terme, ceci pourrait considérer comme un outil d'aide à la décision qui aiderait les producteurs à sélectionner les BCAs à utiliser en fonction des conditions météorologiques observées dans leurs champs à des stades du cycle de vie de la plante et du champignon qui sont critiques pour l'infection et la production de mycotoxines.

À ce jour, il n'existe pas d'étude sur l'influence des facteurs abiotiques sur le comportement des trois BCAs étudiés dans ce travail vis-à-vis de *F. graminearum*. C'est la première étude sur l'effet de l'humidité relative et de la température sur la croissance et la production de DON et de ZEN par *Fusarium graminearum* mais aussi sur les trois BCAs commerciaux.

Il a été observé *in vitro* que l'effet de la température et de l'humidité relative, sur *F. graminearum* et les BCAs pouvait être complexe. Les effets sur la croissance sont différents selon qu'il s'agit du pathogène ou des BCAs. Les BCAs parviennent à limiter la croissance du pathogène quelles que soient les conditions rencontrées *in vitro*, tandis que *Fusarium graminearum* est négativement impacté par l'augmentation de la température. En outre, au-delà de 25°C, sa croissance était fortement réduite. En ce qui concerne la production de mycotoxines, un effet différentiel sur la production de DON et de ZEN a été noté en fonction des conditions. L'efficacité des BCAs dans le contrôle de cette production varie en fonction de la mycotoxine produite et des conditions de culture. Cela indique qu'il existe une différence d'adaptation ou de mécanismes d'adaptation aux facteurs abiotiques entre les microorganismes. En général, le taux de croissance des BCAs augmente avec la température, indépendamment de l'humidité relative, contrairement au pathogène dont la croissance augmente jusqu'à ce qu'il atteigne la température optimale de 25°C, puis diminue. La production de DON par *F. graminearum* a été observée tant en présence qu'en absence de BCAs. En dessous de la température optimale (25°C-28°C) et indépendamment de l'humidité relative, les BCAs ont pu limiter la production de DON. Dans

l'ensemble, les résultats actuels suggèrent des conditions qui devraient attirer la vigilance des producteurs pendant la phase de floraison du blé (prévention), mais aussi pendant le stockage des récoltes, afin de garantir l'absence ou de minimiser la croissance de *F. graminearum* et de la contamination par le DON. Il est donc complexe d'établir une relation simple entre les conditions abiotiques et la contamination globale des cultures par les mycotoxines.

Toutefois, l'efficacité *in vitro* ne garantit pas une efficacité en conditions naturelles. Des tests sur des matrices plus proches de la réalité ont été effectués. La variation de l'humidité relative a été choisie du fait de son importance dans la production de mycotoxine du pathogène. Ce choix est basé sur les résultats préliminaires qui ont montré que ce facteur abiotique impactait positivement la production de mycotoxines du pathogène notamment le DON. Il y avait une différence significative entre les productions spécifiques de DON et de ZEN à 60% et 80% de HR à 25°C de température. La capacité des BCAs à contrôler ces deux productions était aussi impactée. Il paraissait important d'évaluer la capacité des BCAs à contrôler le pathogène et ses mycotoxines dans des conditions plus proches de la réalité au champ.

Les confrontations sur épillets détachés et sur la plante entière ont montré des résultats, en partie confirmatifs comparer aux résultats *in vitro* sur l'efficacité des BCAs dans la lutte contre *F. graminearum.* Mais ils présentent également des contradictions, comme dans le cas de Polyversum, qui semblait être le BCA le plus efficace à contrôler la croissance et la production de mycotoxines du pathogène *in vitro*. Sur épillets détachés et sur plante, il a le moins d'impact négatif sur la production de toxines du pathogène. Cette inefficacité pourrait être due aussi au mode d'inoculation utiliser pour ce BCA, ce qui pourrait lui demander plus de temps pour recouvrer son efficacité. Mycostop et Xedavir étaient moins efficaces que Polyversum dans les tests *in vitro* mais sur épillets et plante, ils inhibent plus la production des toxines du pathogène. Ils jouent aussi un rôle important sur la préservation de la qualité des grains en limitant drastiquement les teneurs en mycotoxines. Xedavir est le seul BCA à préserver l'aspect visuel des grains et leur poids.

Les données expérimentales *in vitro* ont ensuite été utilisées pour concevoir des modèles mathématiques permettant de prédire le comportement (croissance et production de mycotoxines) des microorganismes et ainsi d'avoir une vision prédictive sur leurs potentielles distributions géographiques à différentes échelles spatiales et temporelles.

Cette étude a montré que l'utilisation du modèle primaire de l'équation de Gompertz modifiée permettait de prédire les taux de croissance de *F. graminearum,* Mycostop, Xedavir et Polyversum dans différentes conditions de température et humidité relative. L'équation

modifiée de Gompertz et une équation polynomiale ont servi de base pour concevoir les équations des modèles de prédiction des croissances des BCAs et du pathogène ainsi que le modèle de prédiction de la production de DON du pathogène, respectivement. Ces modèles ont montré leur capacité à prédire les taux de croissance et la production spécifique de DON à différentes températures et 'humidités relatives en fonction du temps.
Il faut noter que la production de mycotoxines est une conséquence combinée des propriétés génétiques d'une souche et des facteurs environnementaux, ce qui signifie que la modélisation mathématique de l'accumulation de mycotoxines n'est pas toujours représentative d'une espèce.

Dans la dernière partie de cette étude, il a été étudié l'influence des variations de température sur les mécanismes de biocontrôle des trois BCAs afin de voir comment l'augmentation de la température pourrait influencer leur l'efficacité. Deux conditions de température, une pour laquelle tous les BCAs réduisent significativement la croissance et la production de mycotoxines (25°C) et l'autre pour laquelle aucun BCA ne les réduit significativement (30°C), ont été sélectionnées pour évaluer leur capacité à s'adapter à des conditions variables.
Ainsi, il a été observé un effet négatif de l'augmentation de la température sur la capacité des BCAs à synthétiser des composés antimicrobiens pouvant inhiber la germination des spores du pathogène. Tous les BCA ont montré une efficacité significative dans le contrôle du pathogène à 25°C, mais Xedavir est le seul BCA qui a démontré une meilleure capacité à s'adapter aux variations de température, en particulier sur sa capacité à inhiber la germination des spores du pathogène. Cependant, l'augmentation de la température (30°C) a significativement affecté les activités des enzymes chitinolytiques, la capacité de biotransformation du DON et l'inhibition de l'expression des gènes *tri5* et *tri8* de tous les BCAs.
Ces résultats ont contribué à une meilleure compréhension du manque d'efficacité des BCAs contre le pathogène sur le terrain en raison de facteurs environnementaux fluctuants, en particulier la température. Ils constituent une base quant à l'amélioration de l'application efficace des BCAs les plus appropriés au champ contre *F. graminearum*, afin de mieux faire face aux défis posés par les facteurs environnementaux dans un contexte de changement climatique.
Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur l'effet des paramètres abiotiques sur l'interaction entre les BCAs et *F. graminearum*, en particulier sur la production de mycotoxines. C'est un levier de base au développement de stratégies de maitrise efficaces et résilientes des risques de contamination par les mycotoxines en utilisant des BCAs contre *F. graminearum*, contribuant ainsi à la sécurité alimentaire mondiale.

Au terme de cette étude, de nombreuses perspectives se sont dégagées, notamment la nécessité d'une amélioration continue des BCAs pour lutter efficacement et raisonnablement contre les pathogènes mycotoxinogènes dans le contexte complexe du monde agricole actuel. Il serait intéressant de quantifier le pathogène sur les grains de blé afin d'évaluer les stratégies développées par Mycostop et Xedavir pour parvenir à inhiber totalement les mycotoxines (si c'est dû à une limitation de la présence du pathogène ou par d'autres mécanismes). Des analyses transcriptomiques seront intéressantes à faire aussi pour identifier des biomarqueurs qui renseignent sur les modes d'actions des BCAs vis-à-vis du pathogène à des fins d'optimisation. Différentes températures fluctuantes peuvent aussi être testées pour se rapprocher encore plus des conditions de terrain.

Pour les recherches fondamentales :

- Elargir les analyses de l'impact des facteurs abiotiques sur le comportement de *Fusarium graminearum* avec différentes souches de la même espèce afin de comprendre comment les facteurs intrinsèques de l'espèce pourraient lui permettre de mieux s'adapter.
- Elargir les cibles des BCAs en les testant avec d'autres pathogènes mycotoxinogènes et sur d'autres substrats que les céréales, mais aussi étudier les interactions tripartites entre la plante, le BCA et le pathogène pour identifier les mécanismes possibles.
- Utiliser les outils « omics » pour mieux évaluer les réponses des gènes et métabolites qui entrent en jeux dans les interactions BCA/pathogène. Des biomarqueurs clés pourraient être identifiés comme spécifique à un BCA donné.

Pour les recherches appliquées :

- Xedavir et Mycostop sont préconisés pour des traitements de sol, leur usage aérien peut être envisager et combiner les deux usages pour maximiser leur efficacité avec des études *à priori* des possibles impacts de leurs métabolites secondaires sur la qualité sanitaires des grains.
- Selon les températures favorables à chaque BCA pour la maitrise du pathogène (croissance et mycotoxines), des traitements mutualisés et synchronisées peuvent être faits en se basant sur les conditions de terrains.