

Etude de la multicontamination des productions végétales de grande culture en conditions de plein champ

Donnat E.¹, Forget F.², Barbaste M.³, Dauguet S.⁴, Faucher S.⁵, Gavaland A.⁶, Gourdain E.⁷, Méléard B.⁷, Denaix L.⁸

¹ ACTA, 149 rue de Bercy, 75595 Paris cedex 12

² INRA UR 1264 MycSA, Centre de Bordeaux Aquitaine, 71 avenue E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon

³ INRA US RAVE, Centre de Bordeaux Aquitaine, 71 avenue E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon

⁴ Terres-Inovia, 11 rue Monge, Parc industriel, 33600 Pessac

⁵ IPREM-LCABIE, UMR 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2 avenue du Président Angot, 64000 Pau

⁶ INRA, UE 0802 Auzeville, Domaine Expérimental d'Auzeville, Centre de recherche de Toulouse, Auzeville

⁷ ARVALIS – Institut du végétal, station expérimentale, 91720 Boigneville

⁸ INRA UMR 1391 ISPA, Centre de Bordeaux Aquitaine, 71 avenue E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon

Correspondance : emilie.donnat@acta.asso.fr

Résumé

Les mycotoxines et les éléments traces sont des contaminants dont la teneur dans les organes récoltés est réglementée pour l'alimentation animale et humaine. Le durcissement des réglementations européennes entraîne la nécessité de mieux connaître l'état et le déterminisme de ces contaminations. L'approche multicontaminants proposée a permis de recueillir des données descriptives et explicatives des contaminations en conditions de plein champ et de leurs effets croisés. Afin de disposer d'une diversité de situations pédologiques et climatiques, les travaux se sont appuyés sur un réseau pérenne de parcelles mis en place à l'échelle du territoire national. Des premières hypothèses relatives aux relations entre les facteurs du milieu, l'itinéraire technique et l'apparition des contaminations ont été émises. Pour garantir la reproductibilité du prélèvement et la traçabilité des échantillons et mesures, un guide d'échantillonnage de grains de blé et de tournesol a été défini et validé pour la détermination de la concentration en éléments traces dans les grains de blé tendre et de tournesol.

Mots-clés : éléments traces, mycotoxines, multicontamination, blé, tournesol

Abstract: Study of multicontamination of crops in field conditions

Mycotoxins and trace elements are contaminants whose content in harvested organs is regulated for feed and food. The tightening of European regulations requires to better understand the state and determinism of these contaminations. The proposed approach of multicontaminants raised descriptive and explicative data contamination in field conditions and their cross effects. In order to have a range of soil and climatic situations, the work was based on a permanent national network of plots. The first hypotheses of relationships between environmental factors, the technical process and contaminations were proposed. To ensure reproducibility and traceability of samples and measurements, a sampling guide for wheat and sunflower grains has been defined and validated for the determination of trace element concentrations in wheat grain and sunflower.

Keywords: trace elements, mycotoxins, multicontamination, wheat, sunflower

Introduction

S'alimenter de manière saine et sûre fait partie des préoccupations permanentes tant des consommateurs que des pouvoirs publics. Dès 2007, les conclusions du Grenelle de l'environnement sont venues renforcer la nécessité de mettre en œuvre des actions pour assurer la protection du consommateur contre les risques sanitaires liés à la contamination des produits de base de l'alimentation humaine et animale. Or, les études sur les niveaux de contamination de l'alimentation française montrent que les végétaux de grande culture, bruts ou transformés, constituent une voie importante de la contamination alimentaire par les mycotoxines et les éléments traces (Leblanc et al., 2004 et 2011) dont la concentration de certains des éléments traces et mycotoxines, compte tenu de leur toxicité, est réglementée pour l'alimentation humaine (EC 1881/2006) et l'alimentation animale (EC 32/2002). En outre, le contexte est très propice à un durcissement de la réglementation concernant la teneur en éléments traces des produits agricoles à destination de l'alimentation humaine et animale, aussi bien au niveau national qu'europpéen. Il est donc essentiel de comprendre les facteurs responsables de ces contaminations. Or, l'analyse de l'état de l'art montre que les avancées ne se sont pas faites à la même vitesse et les voies d'études choisies ont été différentes. Il apparaît clairement que l'effort de connaissance ne s'est pas focalisé sur les mêmes points : pour les mycotoxines, l'effet des paramètres climatiques a été privilégié alors que pour les éléments traces, ce sont les paramètres sols qui ont été étudiés préférentiellement.

Afin de pouvoir mieux progresser, il nous a donc semblé indispensable de suivre conjointement ces deux types de contaminants, en conditions de plein champ, pour mieux appréhender à la fois les transferts d'éléments traces et le développement de champignons mycotoxinogènes, pour évaluer le poids des facteurs sols et climat dans cette accumulation de contaminants, pour alimenter des modèles de prélèvement en construction, proposer des outils de prévention et de gestion pertinents et *in fine* pour conseiller et aider les agriculteurs à limiter les risques de contamination.

Pour mener à bien ce projet visant à anticiper et gérer de manière optimale la multicontamination par les éléments traces et les mycotoxines, l'ACTA, le CETIOM, ARVALIS-Institut du végétal, la chambre régionale d'agriculture d'Aquitaine, l'EPLFPA des Pyrénées-Atlantiques, Bordeaux Sciences Agro, l'Université de Pau et des pays de l'Adour-LCABIE et l'INRA se sont associées pour apporter leur expertise et réaliser des expérimentations communes.

Cette approche multicontaminants n'avait jamais été conduite à notre connaissance et devait permettre de recueillir des données descriptives et explicatives des contaminations en plein champ et de leurs effets croisés.

Les objectifs opérationnels du projet étaient les suivants:

1. définir, valider et optimiser une méthode d'échantillonnage des végétaux commune,
2. mettre en évidence des situations conduisant à un risque de contamination des productions végétales de grande culture et identifier des facteurs explicatifs de ces contaminations (facteurs sol, climat ou conditions de culture) à partir de la construction d'un réseau de parcelles,
3. tester l'impact d'une contamination des sols en cadmium sur la sensibilité des grains de blé à la contamination en mycotoxines.

1. Détermination de la concentration en éléments trace métalliques dans les grains de blé et de tournesol à l'échelle de la parcelle : du guide d'échantillonnage au système expert pour un diagnostic pré-récolte

Du point de vue de la traçabilité des productions, il est nécessaire de disposer d'outils permettant à la fois la détermination de la qualité (en termes de prévention d'une contamination avant commercialisation) et un suivi à long terme impliquant un stockage (DGAL 2007). Toutes les étapes de

cette chaîne d'évaluation doivent être maîtrisées afin de garantir un résultat juste, précis, représentatif et comparable. Cependant, aucun référentiel normatif n'existe en matière de plan d'échantillonnage et de prélèvement des végétaux. Certaines méthodes communautaires décrivent des procédures de contrôle des végétaux de l'échantillonnage à l'analyse (CE 796/2004 ou CE 401/2006). Mais elles sont souvent inapplicables sur le terrain (Veron-Delor, 2007) et spécifiques à un type de végétal ou de contaminant (Champeil, 2004 ; INERIS, 2005). Ainsi, chaque institut technique a établi son propre protocole pour le contrôle des productions de céréales ou d'oléagineux.

Assurer la qualité sanitaire des végétaux de grandes cultures nécessite la mise en œuvre d'outils de diagnostic permettant d'évaluer soit les concentrations en éléments traces métalliques et métalloïdes (ETM) dans les grains (alimentation humaine), soit les concentrations en ETM qui sont potentiellement transférables au végétal. Nous avons investi ces deux aspects en nous focalisant sur l'arsenic, le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc dans les grains de blé et de tournesol, ces ETM étant réglementés ou en voie de réglementation pour l'alimentation humaine et/ou animale.

Ainsi, l'objectif principal de l'étude a été de définir des outils pour maîtriser l'échantillonnage de sols et de végétaux, dans le contexte d'une contamination par les ETM des sols et des grains issus de plantes céréalières et oléagineuses sur une parcelle.

Les analyses d'ETM dans les grains ont été effectuées par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) et par spectrométrie d'émission atomique à plasma induit (ICP-AES) par l'Unité de service et de recherche en analyses végétales et environnementales (USRAVE) de l'INRA accréditée par le COFRAC pour les activités d'analyses/essais/étalonnages. Les analyses de sols ont été effectuées par ICP-MS au LCABIE. La précision (c'est-à-dire la justesse et la répétabilité) de chaque analyse a été vérifiée par des analyses d'échantillons de référence de maïs (V463) et de sol (Loam soil ERM – CC141). Ainsi, la chaîne des opérations depuis la préparation des échantillons jusqu'à leurs analyses a pu être validée.

1.1 Choix du protocole

Le type de protocole retenu est basé sur un prélèvement à la parcelle car il permet, contrairement au prélèvement à la benne, d'effectuer un diagnostic pré-récolte (pour différents stades de croissance de végétal jusqu'à la récolte) et de réaliser un suivi spatial des concentrations en ETM. Il existe de nombreux protocoles de prélèvement de céréales et oléagineux à la parcelle dans la bibliographie. Ces protocoles, établis par des instituts, ont été recensés. Ils présentent les modalités de prélèvement des plantes (nombre de plantes à prélever, localisation des points de prélèvement, etc.) ainsi que la préparation des échantillons (séchage, broyage). Néanmoins, ces protocoles ne sont pas génériques, s'adressant à un seul type de parcelle (à dimension et géométrie fixées), de céréales ou oléagineux et de contaminants. Partant de ce constat, il a été convenu de valider un outil opérationnel de prélèvement utilisable quelles que soient la culture et la parcelle considérées et permettant d'établir un bilan de contamination représentatif de l'ensemble de la production d'une parcelle.

Deux protocoles permettant le prélèvement sur une parcelle de végétaux en cours de croissance et jusqu'à leur maturité ont été sélectionnés. Il a été proposé et décidé d'appliquer deux protocoles :

- le protocole dit « RMQS¹ » : ce protocole a été conçu sur la base du protocole de prélèvement de sols choisi par le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols. Il se veut représentatif des végétaux (et des sols correspondants aux plantes prélevées) sur une placette (c'est-à-dire une zone aux dimensions connues d'une parcelle) ;
- le Protocole d'Echantillonnage Aléatoire Stratifié (PEAS²) : ce protocole, couvrant la totalité de la surface de la parcelle, a été développé en considérant de façon statistique le critère de représentativité

¹ Réseau de Mesures de la Qualité des Sols

² Protocole d'Echantillonnage Aléatoire Stratifié

sur une parcelle, avec la possibilité de spatialisation des résultats obtenus (c'est-à-dire la possibilité de transformer les données ponctuelles issues du prélèvement et de l'analyse des végétaux en une information continue sur l'ensemble de la parcelle). Ceci permet un rendu plus fiable des niveaux de concentration des éléments chimiques suivis.

Afin de valider le choix des parcelles et de procéder dans le même temps à une vérification des outils d'analyse (niveaux de concentration compatibles avec la limite de quantification analytique), des échantillonnages ont été réalisés au printemps 2011 sur du blé au stade tallage et sur les sols correspondants. La faisabilité technique, la représentativité et enfin la robustesse des protocoles de prélèvement à l'échelle de la placette et de la parcelle ont été vérifiées, en particulier pour différentes conditions climatiques et pédologiques. Des prélèvements ont été effectués sur la même parcelle de blé au stade récolte. En 2012, les prélèvements ont été effectués sur cette même parcelle cultivée en tournesol et sur une des deux parcelles cultivées en blé dur. Ceci a permis d'évaluer le protocole sur une même parcelle pour deux cultures différentes mais également pour deux parcelles différentes cultivées avec une même espèce végétale. En 2013, de nouveaux prélèvements ont été réalisés sur de nouvelles parcelles afin d'évaluer la robustesse du protocole d'échantillonnage PEAS.

1.2 Optimisation du protocole

Un premier prélèvement en excès (un millier d'individus), selon le PEAS, a été effectué et des tests de diminution du nombre de plantes et de grains à prélever, et du nombre de points de prélèvement ont été effectués par des analyses statistiques. Ceci a permis d'optimiser le protocole, de réduire le nombre d'individus total prélevés à une cinquantaine et ainsi de rendre ce protocole opérationnel. Il a été déterminé statistiquement que le prélèvement aléatoire de dix grains sur un capitule de tournesol ou la totalité des grains contenus sur deux épis de blé suffit pour assurer la représentativité du point de prélèvement. De plus, le nombre de points de prélèvement sur l'ensemble de la parcelle a été fixé à 25. Ce nombre représente à la fois le maximum acceptable d'un point de vue opérationnel mais aussi le minimum requis pour une analyse géostatistique nécessaire à l'appréhension de la variabilité spatiale des concentrations. De plus, il est identique à celui utilisé pour le protocole du RMQS, protocole nationalement reconnu et accepté. Concernant le PEAS, l'emplacement de ces 25 points a été déterminé de façon à ce que d'une part, la grille de prélèvement couvre l'ensemble de la parcelle et d'une autre part, les points de prélèvement présentent des interdistances les plus variées possibles (ce qui permet d'effectuer des analyses géostatistiques plus fiables). En ce sens, une première grille de prélèvement contenant 20 points générés de façon aléatoire stratifiée et couvrant l'ensemble de la surface de la parcelle a été définie. Ensuite, une seconde grille de prélèvement contenant quatre points générés eux aussi de façon aléatoire stratifiée a été superposée à la première et enfin un dernier point a été placé aléatoirement sur la parcelle afin d'obtenir des distances interpoint plus resserrées. La méthodologie est présentée sur la Figure 1. L'ensemble des analyses statistiques et géostatistiques a été réalisé avec Bordeaux Sciences Agro.

25 prélèvements supplémentaires effectués suivant une grille systématique issue du protocole du RMQS, ont été ajoutés aux prélèvements précédents afin d'obtenir des informations concernant la variabilité des ETM aux faibles pas d'échantillonnage. Certains de ces points ont également été utilisés pour vérifier les prédictions de distribution des ETM établies par le PEAS. La Figure 2 représente l'ensemble de ces 50 points (PEAS + RMQS) appliqués à une parcelle.

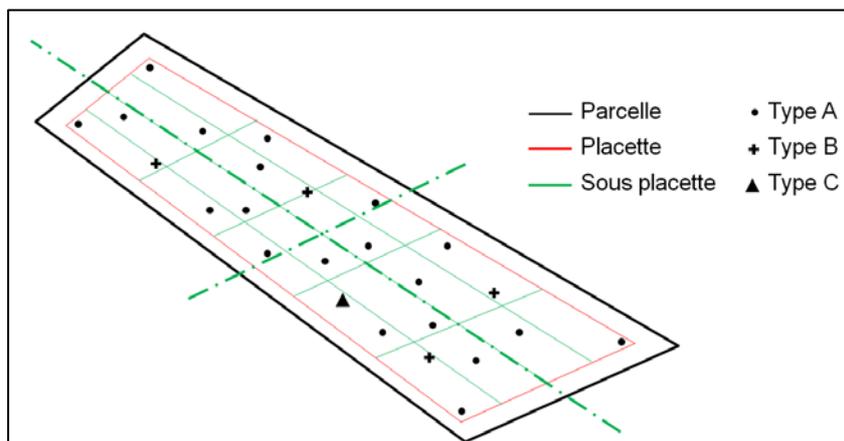


Figure 1 : Définition des points de prélèvement selon le PEAS

1.3 Du guide d'échantillonnage au système expert

Le protocole PEAS optimisé a ensuite été appliqué sur différentes parcelles (plus grandes et plus petites en surface) et pour différentes cultures (blé tendre, blé dur et tournesol). Les analyses géostatistiques ont permis de valider ce protocole d'échantillonnage pour l'évaluation spatiale et à la parcelle des concentrations en éléments traces présents dans les sols et dans les végétaux de grandes cultures considérés dans cette étude.

Au final, des cartes de distribution des concentrations en mg/kg de matière sèche sont obtenues pour différents éléments : Cadmium, Zinc, Cuivre. Un exemple de carte de distribution obtenue pour le cadmium dans une parcelle cultivée en blé est présenté en Figure 3.

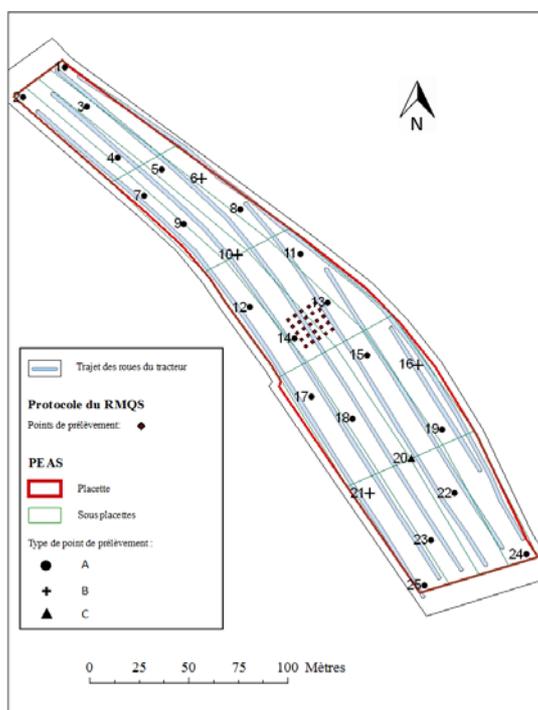


Figure 2 : Application des protocoles d'échantillonnage PEAS et RMQS à la parcelle

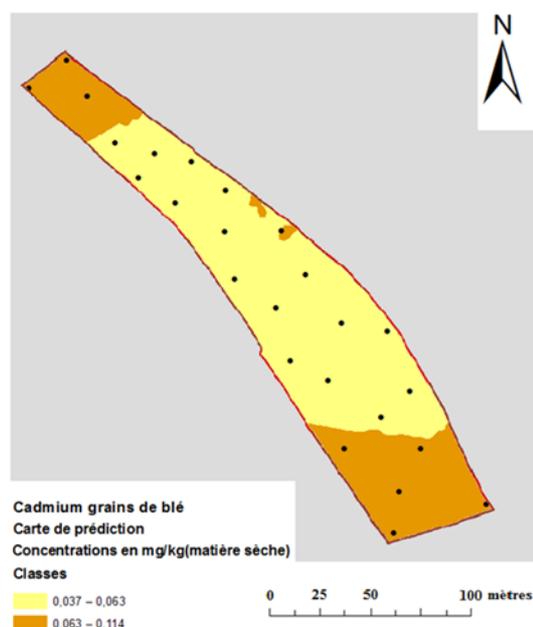


Figure 3 : Distribution du cadmium présent dans les grains de blé à l'échelle de la parcelle

En parallèle du protocole d'échantillonnage, un système expert a également été développé. L'ensemble

permet d'effectuer un diagnostic pré-récolte pour différents stades de croissance du végétal jusqu'à la récolte à l'échelle de n'importe quel type de parcelle.

2. Etat des lieux explicatif des contaminations des sols et des végétaux par les ETM et les mycotoxines à partir de la construction d'un réseau de parcelles

L'objectif de ce volet était de recenser les niveaux de contamination des cultures en conditions de plein champ et d'identifier des facteurs explicatifs du risque de contamination. Pour cela, il s'agissait de construire un réseau de parcelles sur lequel baser l'échantillonnage et le suivi. Le deuxième objectif consistait à mesurer les niveaux de contamination des sols, des plantes et des intrants et à collecter des données explicatives.

Des avancées conséquentes ont été faites ces dernières années sur chacune des composantes de l'interaction tripartite champignon/plante/conditions agro-environnementales, interaction qui conditionne les niveaux de toxines accumulées dans les grains de maïs et de blé récoltés. Rappelons que trois grandes familles de toxines (trichothécènes, zéaralénone et fumonisines) concernent les maïs français, et que seulement deux, trichothécènes et zéaralénone, contaminent les céréales à petits grains. Parmi ces avancées et concernant la flore fusarienne de l'épi, les espèces susceptibles d'être rencontrées sur les céréales françaises ont été répertoriées et les espèces majoritaires ont été caractérisées (toxines, pathogénie). Néanmoins, de nombreuses zones d'ombre subsistent sur l'épidémiologie des espèces fongiques et les conditions de toxinogénèses. Avec la mise au point récente des outils moléculaires d'identification et de quantification (Nicolaisen et al., 2009), l'appréhension de l'ensemble des interactions entre espèces fongiques (intra et inter genres) doit être facilitée. Ces outils maintenant opérationnels sont également très utiles pour suivre l'évolution dans le temps et dans l'espace de la mycoflore présente dans les épis et étudier les évolutions et les tendances durables (producteurs de trichothécènes A vs B par exemple). Pour ce qui est de la composante plante, les études de modulation de toxinogénèse ont fortement suggéré l'existence d'une résistance à l'accumulation de toxines (Boutigny et al., 2008). La validation *in planta* des mécanismes démontrés *in vitro* ainsi que les bases génétiques de cette résistance représentent de nouveaux défis scientifiques. Les outils de quantification de flore en permettant d'apporter une réponse qualitative et quantitative à l'impact des facteurs agro-environnementaux, faciliteront l'élucidation des mécanismes générant cet impact et surtout la définition de pratiques à moindre risque. Au niveau des pratiques agronomiques, les différents facteurs influençant la production de toxines ont été identifiés et hiérarchisés (Champeil et al., 2004).

Les éléments traces sont naturellement présents dans les sols car ils proviennent en partie de la roche. De plus, les sols agricoles des pays industrialisés sont soumis à une pollution diffuse aux éléments traces du fait des retombées atmosphériques, d'intrants agricoles (engrais, produits phytopharmaceutiques, effluents d'élevage) et du rôle qui leur est alloué pour valoriser certains déchets urbains, tels que les boues de station d'épuration. Pour les éléments traces métalliques, le sol est un milieu accumulateur (Robert, 1995 ; Baize, 1997). L'accumulation des éléments traces dans les sols résulte en partie de la présence de ligands forts tels que les matières organiques. La pérennité de ce processus de stockage est actuellement mal connue et certains auteurs pensent qu'il s'agit d'une « bombe à retardement » (time bomb concept), les sols se chargeant en éléments traces tant que les complexes avec la matière organique sont stables (Chang et al., 1997). Sauf dans le cas de contaminations atmosphériques élevées, il semble que la majorité des éléments traces accumulés dans les grains de céréales proviennent du sol (Smolders, 2001). Mais la totalité des éléments présents dans le sol n'est pas disponible pour les végétaux. De nombreuses études ont démontré qu'il n'y a aucun lien direct entre la teneur totale en éléments traces du sol et la concentration dans les végétaux, notamment les concentrations dans les grains de céréales ou les graines oléagineuses (Grant et al., 1998). Pour qu'un élément trace soit absorbé par un végétal, il faut qu'il soit libéré de la matrice solide du sol (dont la matière organique) et qu'il passe en solution. Des paramètres tels que le pH, la teneur en matières

organiques jouent un rôle plus important sur la biodisponibilité que la teneur totale : l'acidification des sols accroît la biodisponibilité des métaux alors qu'une augmentation de la teneur en matières organiques va limiter leur mobilité et biodisponibilité (McLaughlin et Singh, 1999). Le défi est donc de prédire la concentration des éléments traces dans les productions agricoles à destination de l'alimentation humaine. Il n'existe actuellement pas de modèle de prélèvement pour les éléments traces, alors qu'il en existe pour les éléments majeurs tels que l'azote et le phosphore. Les végétaux accumulent différemment les éléments traces. Il a en particulier été démontré que 2 à 4 % des lots de blé dépassent une valeur seuil de 0,2 mg/kg dans certaines régions (Chaudri et al., 1995). Pour la France, il n'existe qu'une seule étude sur du blé qui a analysé les distributions en éléments traces dans différents sols et qui montre que 10 % des lots de blé dépassent la valeur seuil de 0.2 mg Cd/kg sans qu'aucune explication simple ne puisse être trouvée (Sappin-Didier et al., 2002). De plus, des différences importantes s'expriment entre différentes variétés d'une même espèce. Pour le cadmium, on constate des variations d'un facteur 2 à 6 pour le blé tendre (Vinkel, 2001) et 3 à 4 pour le blé dur (Baize et al., 2009) ou d'un facteur 4 pour le grain de tournesol (Li et al., 1995). Mais ces gammes de variations sont dépendantes des sols et des conditions climatiques, sans qu'une explication claire n'ait pu être donnée.

2.1 Mise en place et description du réseau de parcelles

Le réseau est constitué à partir de parcelles des unités expérimentales INRA (25 parcelles pour neuf sites) auxquelles se sont ajoutées des parcelles suivies par les instituts techniques agricoles CETIOM (trois parcelles sur un site) et ARVALIS-Institut du végétal (trois parcelles sur un site), des parcelles de fermes expérimentales de lycées agricoles (30 parcelles sur 15 sites) et des parcelles agriculteurs (deux parcelles sur deux sites). Au total, ce sont donc 63 parcelles qui ont été suivies au cours du projet. Ces parcelles se distribuent sur tout le territoire, avec certaines régions peu ou pas représentées, telles que la Bretagne, l'Alsace, le Limousin. Cependant, l'intégration des partenaires et des parcelles a été progressive. Certaines parcelles ont été suivies plusieurs années de suite. Au total, nous avons ainsi suivi 88 couples sol/plante. En dernière année du projet, des parcelles conduites en agriculture biologique ont également été intégrées.

Les parcelles étaient cultivées en blé dur, blé tendre ou tournesol par les unités ou fermes expérimentales selon leurs itinéraires classiques. La contrainte était de choisir la même variété et d'enregistrer les interventions.

2.2 Echantillonnage et analyses

La couche 0-30 cm du sol a été prélevée chaque année pour les parcelles suivies, selon le protocole RMQS. Dans le détail, une zone homogène de 20m x 20m est définie dans la parcelle, en évitant les zones remblayées et les bordures. Les extrémités de la placette sont repérées grâce à leurs coordonnées GPS afin de conserver la même surface d'échantillonnage pour toute la durée du suivi.

Cette placette est découpée en 25 sous-placettes, au centre desquelles un prélèvement est réalisé. Les vingt-cinq prélèvements par parcelle sont mélangés afin de constituer un échantillon composite représentatif de la parcelle.

Des échantillons de tous les intrants à la parcelle (engrais, amendements, produits organiques) et des semences sont conservés pour analyse.

Sur les sols, des analyses pédologiques classiques sont réalisées : pH, CEC, teneur en carbone organique, en azote, C/N, teneur en CaCO₃, granulométrie. Les teneurs totales en éléments majeurs (Al, Ca, Fe, K, Mn, Na, P) et les teneurs totales en éléments traces (As, Cd, Cs, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Tl, Zn, U) ont été dosées après minéralisation sur les sols et les intrants. Toutes ces analyses ont été réalisées par le laboratoire d'analyse des sols d'Arras, laboratoire central de l'INRA, accrédité COFRAC pour l'ensemble de ces analyses.

Les plantes ont été échantillonnées à deux stades : stade jeune et stade récolte. Le mode de prélèvement a suivi le même protocole que l'échantillonnage des sols. En se plaçant sur la même placette et les mêmes sous-placettes, un plan de tournesol ou deux plants de blé ont été prélevés dans 25 sous-placettes.

Le stade jeune a été défini comme un stade fin tallage pour le blé et un stade 4 paires de feuilles pour le tournesol. Lors de ces prélèvements, seules les parties aériennes ont été récoltées. Au stade récolte, nous avons distingué les grains ou graines, récoltés à part, de la paille (pour le blé) ou partie aérienne sèche (pour le tournesol). Les concentrations des végétaux en Al, As, Cd, Cs, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Tl, Zn, U ont été mesurées par l'USRAVE. Sur les grains de blé à maturité, les mycotoxines ont été analysées par l'UR MycSA. Les différents échantillons récoltés sur les parcelles du réseau ont été analysés pour leur teneur en toxine de *Fusarium* (Extraction, purification SPE, analyse par CLHP/DAD ou MSn) : vingt-trois échantillons de blé ont été analysés pour leur teneur en Déoxynivalenol (DON) et dérivés acétylés (15 et 3-acétyldéoxynivalenol), Nivalénol et Fusarénone X.

2.3 Résultats

2.3.1. Sols

Caractérisation pédologique des sols

Les caractéristiques des sols du réseau sont présentées dans le Tableau 1. Leurs pH varient de 5,5 à 8,6, la majorité des sols ayant un pH neutre à alcalin avec un pH médian de 8,1. Les teneurs en matières organiques varient de 1,3 à 6,8 %. Cependant, les sols dont le pH est inférieur à 8 ont des teneurs en matières organiques constantes, autour de 2 %. Par contre, au-delà de pH 8, la teneur en matière organique est beaucoup plus variable, de 1,5 à 6,8 %.

Tableau 1 : Synthèse des caractéristiques pédologiques (pH, granulométrie, matière organique, CEC) des sols du réseau (63 parcelles)

	pH	Argile %	Limons fins %	Limons grossiers %	Sables fins %	Sables grossiers %	C g/kg	N g/kg	C/N	CEC mmoles H+/100g
Minimum	5,5	6,9	7,2	2,7	2,8	1,2	7,7	0,8	9	3,6
1er quartile	7,2	19,6	23,1	11,3	5,0	2,5	12,2	1,1	10	10,3
Moyenne	7,7	28,2	28,9	22,1	9,9	10,2	16,8	1,5	11	16,5
Médiane	8,1	26,0	30,0	20,4	6,7	7,1	14,2	1,3	10	13,9
3ème quartile	8,4	35,3	33,8	33,5	12,3	14,4	19,5	1,7	11	22,1
Maximum	8,6	51,6	45,4	44,0	36,1	49,6	40,5	4,2	24	44,7

La matière organique des sols a un C/N constant de 10 pour la quasi-totalité des parcelles, sauf pour une, la parcelle CARJAR, dont le C/N de 24 illustre un problème de minéralisation de la matière organique.

La granulométrie des sols de grande culture du réseau varie en majorité entre une texture limono-argileuse et une texture argileuse. Le réseau contient très peu de sols de texture sableuse.

Le Tableau 2 présente les teneurs en éléments majeurs mesurées sur les parcelles du réseau. Le calcium est l'élément dont la teneur est la plus variable. Le sodium varie également beaucoup (d'un facteur 26). Les autres éléments, aluminium, fer, potassium et magnésium et phosphore, varient moins, d'un facteur 7 à 13. L'élément le moins variable est le phosphore. Peut-être est-ce lié à la fertilisation appliquée sur les parcelles de grande culture ?

Il est intéressant de constater que certains éléments varient de la même manière. Ainsi, le potassium et le sodium semblent corrélés (Figure 4). Ces deux éléments sont constitutifs des minéraux de type

feldspaths, présents dans de nombreux sols. Il est donc possible que cette relation soit liée à la nature géogène de ces éléments. De même, le fer, l'aluminium et le manganèse sont corrélés (Figures 5 et 6), suggérant également une origine géogène. Quatre sols se distinguent de la relation entre l'aluminium et le fer ; ce sont les sols issus du site de Lusignan (argiles rouges à châtaigner), qui présentent aussi les plus fortes concentrations en fer.

Tableau 2 : Synthèse des teneurs en éléments majeurs dans les sols du réseau (63 parcelles)

	Al (g/kg)	Ca (g/kg)	Fe (g/kg)	K (g/kg)	Mg (g/kg)	Mn (mg/kg)	Na (g/kg)	P ₂ O ₅ (g/kg)
Minimum	12,0	1,8	6,6	3,6	1,4	258	0,6	1,1
1er quartile	37,5	5,3	20,0	12,6	2,8	479	2,3	1,6
Moyenne	46,0	62,0	27,7	14,7	5,0	732	4,5	2,4
Médiane	43,6	9,5	23,0	14,6	4,2	664	4,2	2,2
3ème quartile	51,4	110,0	32,8	16,7	5,4	794	6,0	3,0
Maximum	85,6	302,0	78,0	27,5	18,3	2290	16,4	8,0
Max/Min	7	171	12	8	13	9	26	7

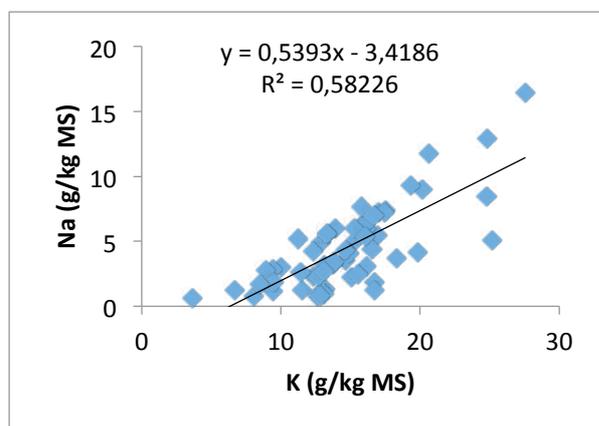


Figure 4 : Relation entre les teneurs en potassium et en sodium dans les sols du réseau

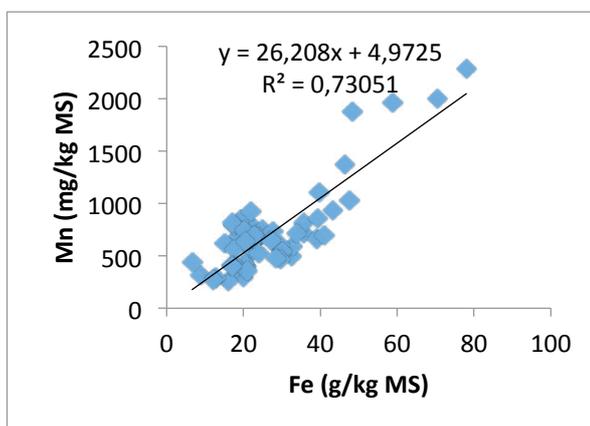


Figure 5 : Relation entre les teneurs en fer et en manganèse dans les sols du réseau

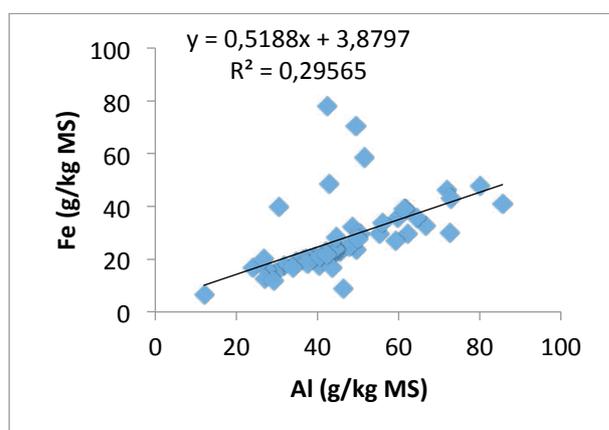


Figure 6 : Relation entre les teneurs en aluminium et en fer dans les sols du réseau

Niveaux de contamination des sols

Il apparaît une forte variation des teneurs pour le plomb, le cuivre et l'arsenic, pour lesquels le facteur de variation (concentration maximale sur concentration minimale) est respectivement de 26, 16 et 14. Pour les autres éléments traces (Cd, Cr, Ni, Tl, Zn ou U), les facteurs de variation sont compris entre 6 et 8. Le césium et le cobalt présentent une distribution intermédiaire, avec un facteur de variation de 10 ou 11.

En comparant nos résultats aux valeurs mesurées sur le réseau de mesure de la qualité des sols qui donne une image de la distribution des éléments traces dans les sols au niveau national sur 2200 échantillons, il apparaît que le premier quartile, la médiane et le 3ème quartile sont systématiquement plus élevés dans notre échantillonnage. Par contre, les valeurs maximales trouvées sont beaucoup plus faibles dans le réseau de parcelles du projet. Ainsi, il semble que les parcelles du réseau soient un peu plus contaminées que l'ensemble des sols français, mais cette contamination reste une contamination diffuse et ne dépasse pas les valeurs agricoles habituelles.

Pour chaque parcelle, nous avons ainsi défini un « profil contaminant » (Figure 7), en normant les concentrations par rapport à la concentration maximale mesurée, ce qui permet, malgré les différences d'ordre de grandeur suivant les éléments, de comparer les éléments entre eux. Ce profil peut être un indicateur pour chaque exploitant.

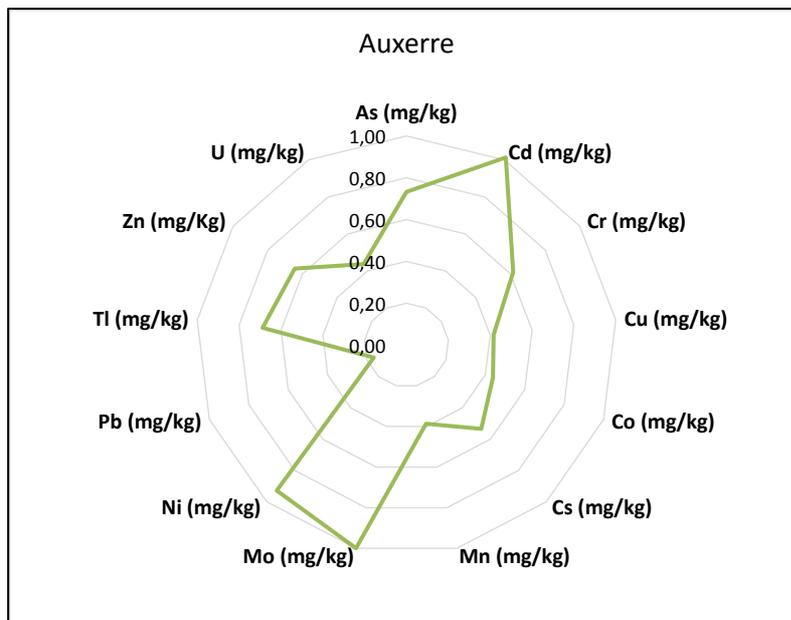


Figure 7 : Exemple d'un profil contaminant, pour les sols des parcelles « Auxerre » montrant une contamination élevée pour le cadmium, le nickel et le molybdène, et une contamination très faible pour le plomb, le cuivre et le cobalt

Au niveau d'une même exploitation, les concentrations en éléments traces sont proches entre les différentes parcelles, variant en moyenne d'une vingtaine de pourcents et au maximum de trente pourcents sauf pour l'arsenic, le cuivre, le plomb et le zinc, éléments beaucoup plus variables d'une parcelle à l'autre. La nature du sous-sol peut être différente et expliquer ces variations mais c'est surtout l'usage ancien des sols qui peut expliquer des teneurs élevées dans une même exploitation.

Relations entre éléments traces et éléments majeurs dans les sols

L'analyse en composante principale des concentrations mesurées dans les sols permet de faire des classes d'éléments dont les concentrations vont globalement évoluer de la même manière. Ainsi, l'arsenic (sauf pour une parcelle), le cobalt, le chrome, le manganèse, le nickel, le plomb (sauf pour une parcelle) et l'uranium sont plus ou moins fortement corrélés au fer. Le césium présente cette même corrélation si on exclue un site, qui montre une relation différente. Le même cas s'observe pour le molybdène et le zinc. Le fer étant un élément géogène, cela laisse à supposer que les éléments traces corrélés le sont aussi.

Des relations statistiques ont ainsi pu être établies, permettant d'estimer la concentration en éléments traces d'un sol à partir de la seule teneur totale en fer, sauf pour les sols du site de Lusignan.

Les relations observées sont donc les suivantes, la concentration en fer étant exprimée en g/kg MS alors que les concentrations des éléments traces s'expriment en mg/kg MS :

$$[\text{As}]_{\text{sol}} = -0.97 + 0.617 [\text{Fe}]_{\text{sol}} \quad (p < 0.001 ; R^2 = 0.63)$$

$$[\text{Co}]_{\text{sol}} = 1.301 + 0.339 [\text{Fe}]_{\text{sol}} \quad (p < 0.001 ; R^2 = 0.78)$$

$$[\text{Cr}]_{\text{sol}} = 26.448 + 1.102 [\text{Fe}]_{\text{sol}} \quad (p < 0.001 ; R^2 = 0.48)$$

$$[\text{Ni}]_{\text{sol}} = 11.794 + 0.459 [\text{Fe}]_{\text{sol}} \quad (p < 0.001 ; R^2 = 0.48)$$

$$[\text{Pb}]_{\text{sol}} = 12.348 + 0.598 [\text{Fe}]_{\text{sol}} \quad (p < 0.001 ; R^2 = 0.45)$$

$$[\text{U}]_{\text{sol}} = 1.368 + 0.037 [\text{Fe}]_{\text{sol}} \quad (p < 0.001 ; R^2 = 0.22)$$

Pour les parcelles qui s'écartent de cette relation, il est alors possible de suspecter, soit une anomalie géochimique, soit une contamination du sol. Pour le cadmium et le cuivre, il n'y a par contre aucune relation avec aucun des éléments majeurs analysés, ce qui laisse à supposer que la concentration en ces éléments dans le sol n'est pas majoritairement liée au fond pédogéochimique mais à d'autres facteurs.

Influence de la roche mère sur le niveau de contamination des sols

Les relations entre le fer et certains éléments suggèrent une importance de la roche mère pour expliquer les teneurs variables en éléments traces. Ainsi, nous avons cherché à classer les sols suivant leur roche mère.

Le Tableau 3 synthétise les concentrations minimum, maximum, médianes et moyennes en fonction du substrat géologique. Il apparaît que pour l'arsenic, le cuivre, le cobalt, le césium, le nickel et le zinc, il n'y a pas de différence notable entre les domaines géochimiques. Pour le cadmium, une différence remarquable apparaît entre les sols sur substrats calcaires, ces sols présentant des teneurs en moyenne plus élevées. Pour le chrome, les concentrations semblent plus importantes sur les substrats calcaires et sur les roches cristallines acides. Pour le plomb, les calcaires et les alluvions présentent des concentrations plus élevées.

Autres facteurs explicatifs des niveaux de contamination rencontrés

Les concentrations en cadmium et en cuivre dans les sols n'ont pas de lien avec le fer, ni avec aucun des éléments majeurs présents dans le sol. Cela peut s'expliquer pour ces éléments par une origine exogène. En effet, il est connu que le cadmium est apporté par les engrais minéraux, et une fertilisation régulière et ancienne pourrait lisser les différences pédogéochimiques.

Le cuivre est un élément utilisé comme fongicide sur la vigne, en arboriculture et en cultures légumières. Il est de plus fortement présent dans les lisiers. Les concentrations en cuivre les plus élevées relevées sur des parcelles du réseau peuvent s'expliquer par l'historique de ces parcelles, qui possèdent un antécédent viticole ou arboricole. L'arsenic a également été utilisé en arboriculture ou viticulture, pour lutter contre les maladies du bois. Cependant, sur le réseau, les teneurs élevées en cuivre ne s'accompagnent pas de teneurs élevées en arsenic. La présence d'arsenic semble donc plus liée au fond pédogéochimique.

Tableau 3 : Teneurs en ETM dans les différents substrats géologiques rencontrés (46 parcelles étudiées)

en mg/kg		As	Cd	Cr	Cu	Co	Cs	Ni	Pb	Zn	U
Alluvions (13 parcelles)	Minimum	8,7	0,12	24,9	7,6	3,4	0,004	9,75	18,35	28,5	1,7
	Maximum	51,5	0,43	68,2	72,5	14,3	0,02	36,11	79,90	119	2,7
	Moyenne	21,2	0,27	50,1	25,6	9,2	0,008	24,44	35,35	76,6	2,0
	Médiane	13,4	0,29	46,7	22,5	9,6	0,006	22,08	25,96	80,93	1,8
Sables (1 parcelle)		7,6	0,16	39,0	12,9	3,3	0,003	9,32	15,96	33,2	2,2
Calcaires (26 parcelles)	Minimum	9,4	0,18	40,9	10,1	4,3	0,002	12,40	17,48	40,5	1,4
	Maximum	39,5	0,64	132	120,5	25,8	0,014	43,93	140,8	121	3,6
	Moyenne	18,1	0,37	70,4	21,9	11,2	0,006	25,47	36,59	73,5	2,4
	Médiane	13,6	0,35	65,4	17,0	10,0	0,005	23,87	24,12	68,7	2,4
Gneiss, roches cristallines et roches acides (2 parcelles)	Minimum	9,2	0,12	57,1	17,6	7,2	0,002	16,63	19,30	56,9	2,3
	Maximum	21,9	0,45	99,2	21,9	16,3	0,014	43,76	35,66	109,6	2,9
	Moyenne	15,5	0,29	79,1	19,6	11,6	0,008	29,80	27,14	83,1	2,6
	Médiane	15,5	0,30	80,2	19,4	11,3	0,008	29,40	26,81	82,9	2,6
Marnes et argiles (4 parcelles)	Minimum	18,4	0,27	19,2	10,4	3,9	0,004	6,99	16,81	41,2	1,3
	Maximum	18,4	0,27	83,2	27,6	16,0	0,013	31,95	32,66	131,2	7,6
	Moyenne	18,4	0,27	57,2	17,7	10,0	0,006	21,07	24,91	74,8	4,1
	Médiane	18,4	0,27	63,1	16,4	10,1	0,005	22,67	25,09	63,3	3,7

2.3.2. Les intrants

Niveau de contamination des intrants

L'ensemble des fertilisants et amendements apportés à la parcelle ont été prélevés. Les amendements organiques ont systématiquement été analysés pour leur teneur en éléments traces, alors que seule une partie des fertilisants minéraux, pour lesquels nous avons un plus grand nombre d'échantillons, ont été analysés. Ces analyses confirment que les engrais phosphatés sont les plus concentrés en éléments traces. C'est en particulier le cas pour le cadmium, dont la concentration mesurée dans les engrais organiques est inférieure à la limite de quantification alors qu'elle est supérieure à 2 mg/kg MS pour tous les engrais minéraux contenant du phosphore. Cette analyse montre aussi que l'ammonitrate possède des concentrations très faibles en éléments traces. Cependant, la méthode d'analyse de cet engrais a été différente, car celui-ci étant explosif, une attaque totale était impossible.

Flux annuels apportés par les intrants

Les pratiques actuelles pendant les quatre ans de suivi des parcelles ont été recensées et analysées. Plusieurs types d'intrants sont utilisés selon les cultures. L'engrais le plus courant est un engrais azoté de type ammonitrate. Les parcelles en agriculture biologique ne reçoivent que des amendements organiques. En agriculture conventionnelle, l'apport d'engrais azoté se fait soit seul, soit associé à des engrais phosphatés ou potassiques, des engrais organiques, des amendements calcaires, ou encore des oligo-éléments.

Le volume apporté annuellement pour chaque type d'intrant varie. Ainsi, pour estimer la contamination diffuse induite par une pratique, il n'est pas seulement nécessaire d'analyser la concentration dans les engrais utilisés mais il faut aussi calculer les flux d'éléments arrivant à la parcelle.

Quel que soit le mode de fertilisation, les éléments apportés en plus grande quantité sont le zinc et le cuivre. Dans le cas de fertilisation minérale, une fertilisation azotée apporte moins de 10 grammes par hectare de zinc et de cuivre. Une fertilisation minérale associant des engrais azotés, phosphatés et potassiques augmente fortement les flux de cadmium et de zinc à la parcelle. Compte tenu des volumes beaucoup plus importants d'engrais organiques apportés, notamment dans le cadre de l'agriculture biologique, nous obtenons des flux entrant à la parcelle beaucoup plus élevés, d'un facteur cinquante par rapport à une fertilisation minérale. Cependant, le faible nombre de parcelles suivies en agriculture biologique ne permet pas de conclure.

2.3.3. Les végétaux

Le blé tendre

Les analyses de blé tendre se basent sur un total de 56 échantillons prélevés sur le réseau, sur 23 sites différents, en quatre ans. La majorité des échantillons (29 au total) correspondent à la variété retenue dans le projet (Caphorn). Cependant, suite à des problèmes d'approvisionnement, de non compatibilité avec la conduite en agriculture biologique, de nombreux sites n'ont pas cultivé cette variété et il faudra tenir compte de la variabilité variétale pour analyser les résultats.

En moyenne, le grain de blé tendre accumule les éléments dans l'ordre suivant :

Zn > Cu > Cr-Ni-Mo-Pb > Co-Cd > As > U - Cs.

En comparant à la réglementation pour l'alimentation humaine, il apparaît qu'un seul échantillon de grain de blé tendre présente une concentration de cadmium supérieure au seuil réglementaire. Cette parcelle correspond à un sol acide, sableux, qui avait été mis en culture pour l'expérimentation après plusieurs années de jachère. Ainsi, le pH faible du sol permet d'expliquer la forte biodisponibilité et donc la concentration mesurée dans le grain de blé.

Pour le plomb, tous les résultats sont inférieurs à la réglementation, sauf un dont la concentration mesurée fait penser à une contamination. Il est en cours de réanalyse.

Pour l'alimentation animale, tous les lots de grains analysés sont inférieurs aux seuils réglementaires.

Pour les mycotoxines, les concentrations ont toutes été inférieures aux limites de quantification en 2011. En 2012, seuls le déoxynivalenol (DON) et son dérivé 15-acétyldéoxynivalenol ont été détectés, dans 31 et 85 % des cas, respectivement. Ainsi, la moyenne des échantillons supérieurs au seuil de quantification en DON était supérieure à la limite de la réglementation pour l'alimentation humaine. Par contre, dans tous les cas, les valeurs atteintes étaient inférieures aux recommandations pour l'alimentation animale (8000 µg/kg pour le DON et 2000 µg/kg pour la zearalénone). En 2013, La contamination par les mycotoxines a été plus fréquente mais les concentrations atteintes ont été plus faibles que les années précédentes. Tous les échantillons ont des concentrations inférieures aux recommandations pour l'alimentation animale ; par contre, 20 % des échantillons dépassent les concentrations en DON recommandées pour l'alimentation humaine et 13 % dépassent les valeurs pour la zearalénone. Les variabilités interannuelles s'expliquent par les conditions climatiques.

Les pailles ont également été analysées pour les teneurs en éléments traces. En moyenne, la paille de blé tendre accumule les éléments dans l'ordre suivant :

Zn > Cu > Cr-Mo > Ni > Pb > As > Co-Cd > U-Cs.

Il est intéressant de constater que les concentrations en éléments traces sont plus élevées dans la paille que dans le grain, sauf pour les deux oligoéléments, le cuivre et le zinc, pour lesquels c'est l'inverse.

Les pailles étant consommées par les animaux d'élevage, les concentrations en arsenic, cadmium et plomb ont été comparées à la réglementation européenne pour l'alimentation animale. Il apparaît que toutes les concentrations sont inférieures à la réglementation sauf pour l'arsenic, sur une parcelle, en 2011.

La comparaison entre les concentrations mesurées dans la paille et les concentrations mesurées dans le grain montre qu'il n'y a pas de relation simple pour l'arsenic, le chrome, le cobalt, le cuivre, le nickel, le plomb. Par contre, pour le molybdène, le cadmium et dans une moindre mesure le zinc, la concentration dans le grain est linéairement reliée à la concentration dans la paille. Des valeurs extrêmes pour le plomb, le nickel et le chrome doivent être à nouveau vérifiées. La relation linéaire étroite entre le chrome et le nickel dans les pailles ($R^2 = 0.92$) suggère une contamination par des poussières d'inox, pouvant intervenir lors de l'étape de broyage et doit donc être vérifiée par un broyage différent.

Le blé dur

Les analyses de blé dur se basent sur un total de quinze échantillons, collectés sur quatre sites et dix parcelles différentes, en quatre ans. La majorité des échantillons, soit onze échantillons correspondent à la même variété, Isildur.

En moyenne, le grain de blé dur accumule les éléments dans l'ordre suivant :
 $Zn > Cu > Mo > Ni > Pb - Cd > Cr > Co-As > Cs-U$.

Le blé dur semble plus accumulateur de zinc et cadmium, et dans une moindre mesure, de cuivre, de molybdène et de nickel que le blé tendre. Cependant, le faible nombre d'échantillons de blé dur et le manque de sites où sont cultivés conjointement du blé dur et du blé tendre ne nous permettent pas d'être affirmatifs quant à ces résultats, qui doivent être confirmés. Ils confirment néanmoins les observations réalisées par ARVALIS-Institut du Végétal.

En comparant à la réglementation pour l'alimentation humaine, nous constatons des dépassements pour le cadmium pour deux échantillons de grains de blé, cultivés deux années de suite sur la même parcelle. Comme pour le blé tendre, il s'agit d'une parcelle initialement à pH acide.

Pour le plomb, nous dépassons les valeurs réglementaires pour trois échantillons différents, un échantillon récolté sur la parcelle dont la concentration en plomb dans le sol est la plus élevée, mais également sur deux parcelles différentes d'un autre site, sans que des explications simples puissent être trouvées. Ainsi, sur la totalité des échantillons de blé dur, un tiers des échantillons n'est pas conforme à la réglementation pour l'alimentation humaine, soit à cause du cadmium, soit à cause du plomb. Mais là encore, le faible nombre d'échantillons récoltés ne nous permet pas de conclure de manière définitive.

Concernant les concentrations en mycotoxines mesurées sur les grains de blé dur, il apparaît que ces valeurs ont été systématiquement faibles durant les trois années de suivi et inférieures à la réglementation.

Pour le grain de blé dur, la contamination qui pose problème est donc une contamination par les éléments traces.

Concernant les pailles, comme pour le blé tendre, il apparaît que les concentrations en oligoéléments cuivre et zinc sont plus faibles dans les pailles que dans les grains. L'inverse s'observe pour tous les autres éléments traces. Les valeurs obtenues dans les pailles indiquent qu'elles sont conformes à la réglementation pour l'alimentation animale.

Il existe une relation stricte entre la concentration dans la paille et la concentration dans le grain, pour le cadmium et le zinc. Pour les autres éléments, aucune corrélation n'apparaît. Cette relation est forte pour une variété donnée, elle existe mais est plus lâche si l'on considère l'ensemble des variétés de blé dur cultivés sur le réseau.

Le tournesol

Les analyses de tournesol se basent sur un total de dix-sept échantillons prélevés sur cinq sites. Compte tenu du faible nombre d'échantillons, une analyse globale sur la totalité des années de

prélèvement a été réalisée. L'ensemble des tournesols appartiennent à la variété Extrasol, sauf un échantillon à cause d'un problème technique.

Il apparaît qu'en moyenne, la graine de tournesol accumule les éléments traces dans l'ordre suivant : Zn > Cu > Ni-Mo > Cr-Cd > Pb-As > Co > U-Cs.

Il n'y a pas de réglementation en alimentation humaine concernant le tournesol. Les recommandations discutées suite aux évaluations de l'EFSA pour le cadmium proposaient une valeur de 0,6 mg/kg MF. Si on se réfère à cette valeur, deux échantillons ont des concentrations supérieures à cette recommandation. Ces situations correspondent à des sols acides. Concernant le plomb et l'arsenic, les teneurs sont faibles par rapport aux concentrations observées dans le blé. Par contre, les valeurs obtenues pour le nickel dans la graine de tournesol sont beaucoup plus élevées que dans le grain de blé.

Les relations, au stade récolte, entre les teneurs en éléments traces dans les parties aériennes et les teneurs dans les graines ont été regardées. Il apparaît une relation linéaire positive pour l'arsenic, le cadmium et le cuivre, ainsi qu'une tendance pour le zinc.

4. Approche multicontaminants : impact d'une contamination des sols en Cadmium sur la sensibilité des grains de blé à la contamination en mycotoxines

Le volet 3 du projet devait tester l'hypothèse d'un effet d'un stress oxydatif induit par la contamination en éléments traces du sol sur l'infestation des plantes par *Fusarium* incluant l'étude de la contamination des grains en mycotoxines. Nous avons réalisé une culture de blé dur sur des parcelles présentant un gradient de contamination suite à des apports répétés de boues de station d'épuration. Les teneurs en métaux totaux à la récolte ont été mesurées. Les grains de blé ont été récoltés afin de réaliser une inoculation par des champignons mycotoxinogènes. Parallèlement, nous avons regardé l'action directe du cadmium sur la biosynthèse de trichothécènes de type B (TCTB) par *F. graminearum* et *F. culmorum*.

La première phase a consisté en l'expérimentation sur des grains issus des parcelles contaminées (Figure 8). La seconde phase a consisté en l'étude *in vitro* sur l'effet du cadmium sur la toxigenèse (Figure 9) et enfin la dernière étape a été de comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'effet du cadmium sur la toxigenèse chez *Fusarium*.

Pour mieux comprendre les mécanismes de co-contamination du Cd et des TCTB, et l'impact de leurs interactions éventuelles sur leur accumulation dans les grains, nous avons donc étudié l'effet du stress induit par la présence du Cd sur *Fusarium*. Nous avons mené deux types d'expérimentation : la 1^{ère} consistait à inoculer *F. graminearum* sur des grains de blé dur issus de plantes cultivées sur des sols avec différents niveaux de contamination de Cd. La 2^{ème} menée *in vitro* avait pour objectif d'étudier l'effet du Cd sur le développement et la toxigenèse de souches de *F. graminearum* et *F. culmorum*.

3.1 Expérimentation sur grains

Des cultures de blé dur ont été réalisées sur des parcelles présentant un gradient de contamination en Cd. Les épis récoltés ont été égrainés manuellement, puis les grains inoculés avec *Fusarium graminearum* et *F. culmorum*. Deux souches ont été utilisées, une de chémotype DON/ADON (INRA 215) et une de chémotype NIV/FX (INRA 337). Après incubation trois semaines à 25 °C et en conditions d'humidité optimale pour le développement du pathogène fongique, les grains ont été séchés, broyés et analysés pour leur teneur en ergostérol (marqueur du développement fongique) et mycotoxines. Pour les grains issus du site Louis Fargues avec un gradient de Cd dans le sol allant de 4 à 24 mg/kg, le niveau de contamination est tel qu'il ne permet pas de visualiser des différences en termes de développement fongique et production de toxines. Pour les grains récoltés sur les parcelles

Ambares (gradient de Cd entre 0,2 et 7 mg/kg), il apparaît clairement que la production de toxines par unité de champignon est significativement augmentée pour les parcelles les plus contaminées et ce pour la souche productrice de DON/ADON (Figure 10). Un résultat plus modéré sur la production de toxines NIV et FX par unité de champignon est observé sur les parcelles les plus contaminées dont les grains récoltés ont été inoculés par la souche NIV/FX.

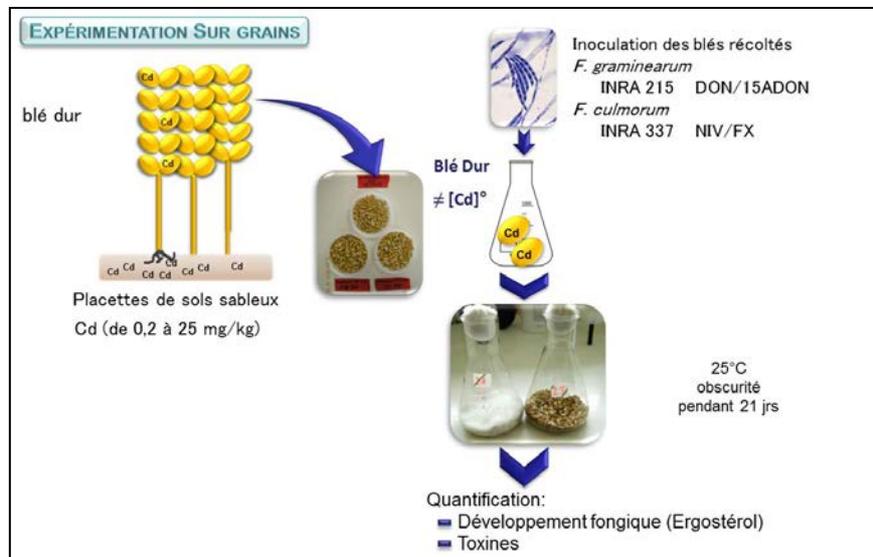


Figure 8 : Description de la démarche pour l'expérimentation sur grains cultivés au champ sur site contaminé

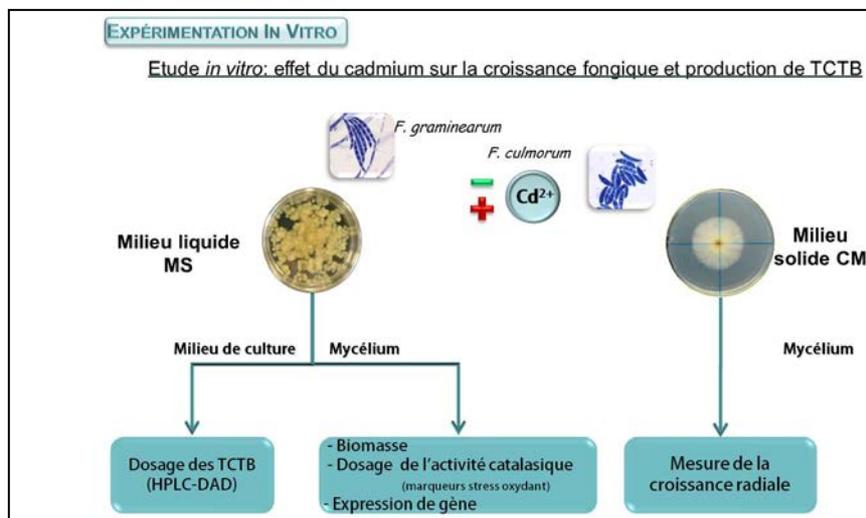


Figure 9 : Description de la démarche pour l'expérimentation *in vitro*

Dans cette première approche, l'inoculation de *F. graminearum* (DON/15ADON) ou *F. culmorum* (NIV/FX) sur des grains issus de sols contaminés conduit à des développements et productions de toxines différents selon le lot de grains et la souche considérée. On observe au niveau du développement fongique une augmentation pour la souche NIV/FX et une diminution pour la souche DON/ADON sur les grains issus de sols très contaminés. La comparaison des teneurs en toxines du lot témoin et autres lots indique une augmentation de la productivité, significative pour le DON, plus faible pour la NIV. Les effets observés ne sont pas corrélés aux teneurs en Cd des grains. Sont-ils dus à des effets des autres éléments traces ? Ou à une modification du grain induite par le Cd dans le sol ?

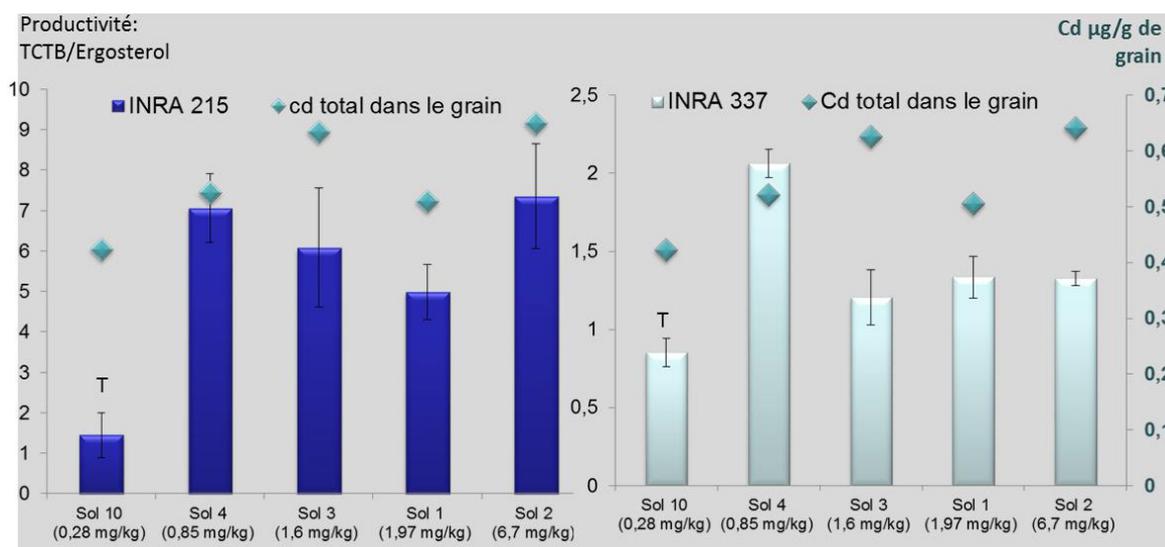


Figure 10 : Productivité en toxines (toxines/U de biomasse) sur grains issus de sols contaminés d'Ambarès

3.2 Expérimentation *in vitro*

Dans un premier temps, l'effet du Cd sur la croissance a été testé sur deux souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* et cinq concentrations de Cd (0- 250µM) en milieu gélosé.

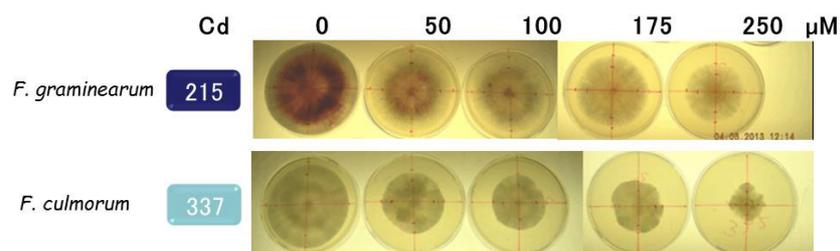


Figure 11 : Effet du Cd sur la croissance de *F.graminearum* et *F.culmorum* en milieu solide

La croissance des souches de *Fusarium* est affectée par concentration croissante de cadmium (Figure 11). La souche de *F. graminearum* semble moins sensible au Cd que la souche de *F. culmorum*. On remarque des valeurs de concentration d'inhibition 50 (CI50) différentes selon le mode d'inoculation, avec des valeurs inférieures lorsque on inocule à partir de spores. Il y a un effet fongitoxique du Cd sur *Fusarium* qui s'exerce aussi bien sur la germination des spores que la croissance mycélienne.

L'effet du Cd sur la croissance fongique a été testé en milieu liquide également. Une gamme de concentration de Cd a été testée (0 à 10µM). Une mesure de biomasse sèche a été réalisée après 4 et 15 jours de culture. La CI50 est de l'ordre de 10µM pour la souche INRA 215 et de 7 µM pour la souche INRA 337 à 4 jours de culture. A 15 jours, les CI50 sont significativement plus élevées (9µM INRA 337 et > 10µM INRA 215).

In vitro en milieu liquide, nous avons testé une première gamme de concentration suivante : 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10µM sur la production de toxines sur *F. graminearum* (DON/ ADON) et *F. culmorum* (NIV/FX). On observe une inhibition de la production de TCTB quelle que soit la souche et dès les concentrations les plus faibles. Cette inhibition est significative à partir de la concentration de 4µM. La souche INRA 215 (DON/15ADON) comme pour la CI50 est moins sensible que la souche *F. culmorum* INRA 337 (NIV/FX).

Cette expérience a été menée sur un plus grand nombre de souches appartenant aux espèces *F. graminearum* (5) et *F. culmorum* (5) de différents chénotypes (Type de TCTB produit : DON/15ADON, DON/3ADON et NIV/FX) à la concentration de 4µM.

On observe une inhibition de la production de TCTB sur les dix souches testées quels que soient l'espèce ou le chémotype considéré. Le Cd inhibe significativement la production de TCTB. On observe une sensibilité différente des souches avec une inhibition qui va de 100% à 40% (Figure 12).

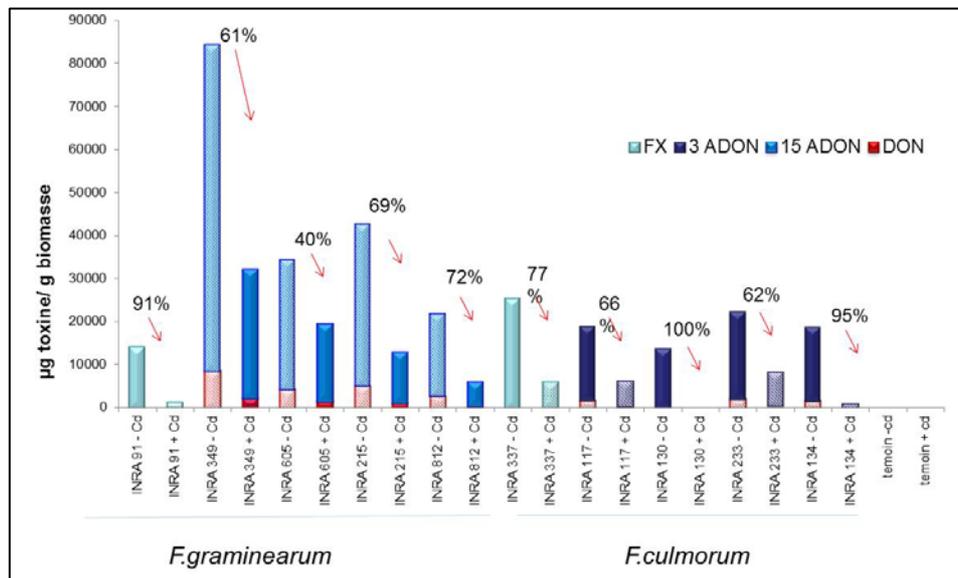


Figure 12 : Effet du Cd à 4 µM sur la production de TCTB chez 5 souches de *F. graminearum* et 5 souches de *F. culmorum* après 12 jours de culture

Pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'effet du cadmium sur la croissance et la toxigenèse, nous avons regardé s'il y avait une modulation de l'activité enzymatique impliquée dans la réponse au stress oxydant : de type catalasique d'une part, et modulation de l'expression de gène codant pour des enzymes impliquées dans le stress oxydant (SOD, glutathion peroxydase) d'autre part. Nous avons aussi regardé si la modulation de la toxigène en présence de Cd était un élément de réponse de *Fusarium* au stress oxydant induit par Cd. Pour ce faire, nous avons utilisé pour l'expérience suivante des souches affectées dans leur réponse au stress oxydant (délétées pour FgAP1).

On observe que l'activité catalase est augmentée en présence de Cd pour la souche de *F. graminearum* INRA 215 (Figure 13).

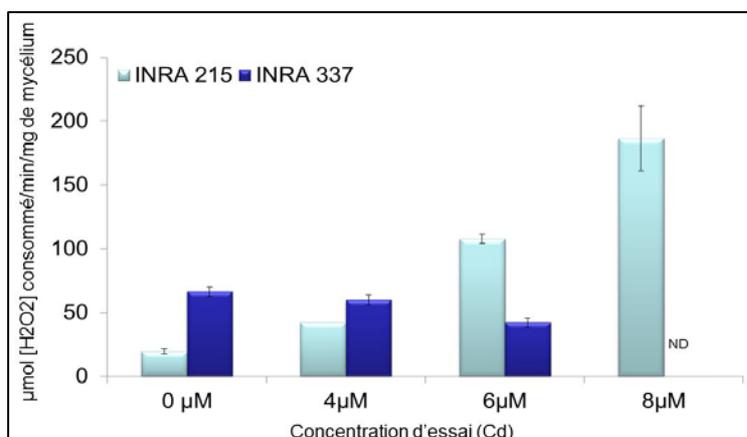


Figure 13 : Modulation de l'activité catalase par le Cd- Dosage de l'activité enzymatique catalase à 4 jours de culture pour les souches INRA 215 et INRA 337 à différentes concentrations de Cd

3.3 Mécanismes mis en jeu dans l'effet du cadmium sur la toxigenèse chez *Fusarium*

Nous avons étudié le stress oxydant induit par le Cd à 4 μ M à 4 et 12 jours de culture sur des souches de *F. graminearum* mutante pour FgAP1 (INRA 91, INRA 91 Δ YAP de chémotype NIV/FX ; INRA 605, INRA 605 Δ YAP, INRA 605 constitutive de chémotype DON/ADON). Nous observons que les souches délétées pour FgAP1 ont leur production de toxine affectée comme la souche sauvage par la présence de Cd dans le milieu. Ainsi, l'effet du Cd observé ne met pas en jeu la réponse au stress oxydant régulé par FgAP1.

Enfin, nous avons étudié l'effet du Cd pour les souches (INRA 91, INRA 215, INRA 337 et INRA 605) sur l'expression de deux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCTB (TRI5 et TRI4) et trois gènes codant pour des enzymes impliquées dans le stress oxydant (MnSOD2, CuZnSOD et Glutathion peroxydase). On observe pour trois de ces quatre souches qu'en présence de Cd on a une augmentation de l'expression de ces trois gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant mais l'activation de leur expression ne passe pas par FgAP1.

En conclusion

La constitution d'un réseau de parcelles, associée à une banque d'échantillons et une base de données, pour analyser les occurrences et les valeurs extrêmes a permis d'avoir une meilleure vision de la multicontamination des productions de grande culture et de valider certaines hypothèses explicatives. Les résultats ont été obtenus dans des conditions de plein champ, en système de culture réel, en intégrant l'ensemble de l'itinéraire technique et sont par conséquent proches de la réalité du terrain. A partir des résultats rassemblés, organisés et analysés, un manuel pratique pour l'anticipation et la gestion optimale de la contamination naturelle des grains ou graines en plein champ par les mycotoxines de *Fusarium* et les éléments traces a été élaboré sous la forme de 18 fiches (consultables sur le site Internet du RMT Quasaprove : <http://www.quasaprove.org/moodle/course/view.php?id=78>).

La double validation statistique et expérimentale du protocole proposé pour connaître la variabilité des concentrations en ETM, associée à l'étude géostatistique a abouti à la mise en place d'un système expert qui permet de répondre aux objectifs quelle que soit l'hétérogénéité de la parcelle.

Vis-à-vis des mécanismes de co-contamination, nous avons pu démontrer un effet du Cd sur *F. graminearum* et *F. culmorum*, modulant son développement et sa production de toxines, l'intensité de cet effet dépendant de la souche et de l'espèce. L'interaction entre ces deux contaminants demande à être élucidée par une compréhension fine des mécanismes de modulation mis en jeu.

Références bibliographiques

- Baize D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France): INRA Editions.
- Baize D., 2009. Cadmium in soils and cereal grains after sewage-sludge application on French soils. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29 (1), 175-18.
- Baize D., Bellanger L, Tomassone R., 2009. Relationships between concentrations of trace metals in wheat grains and soil. *Agronomy for Sustainable Development*, 29 (2): 297-312.
- Boutigny A-L., Richard-Forget F., Barreau C., 2008. Natural mechanisms for plant resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 121, 411-423.
- Champeil A., Doré T., Fourbet J-F., 2004. *Fusarium* head blight: epidemiologic 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.

- Chang A.C., Hyun H.N., Page A.L., 1997. Cadmium uptake for Swiss chard grown on composted sewage sludge treated field plots: Plateau or time bomb? *Journal of Environmental Quality* 26, 11-19.
- Chaudri A.M., Zhao F.J., McGrath S.P., Crosland A.R., 1995. The cadmium content of british wheat grain. *Journal of Environmental Quality* 24, 850-855.
- DGAL, 2007. Direction Générale de l'Alimentation – Note de service DGAL/SDQPV/N2007-8126 : Programme national de biovigilance 2007-2008.
- Grant C.A., Buckley W.T., Bailey L.D., Selles F., 1998. Cadmium accumulation in crops. *Canadian Journal of Plant Science* 78 (1), 1-17.
- INERIS, 2005. Campagne de prélèvement autour du site sinistré de SBM formulation – Rapport d'étude DRC-05-71165/DESP-R01A, 30 août 2005.
- Leblanc J-C., 2004. Etude de l'Alimentation Totale française, Anses.
- Leblanc J-C., 2011. Etude de l'Alimentation Totale française 2, Anses.
- Li Y.M., Chaney R.L., Schneiter A.A., Miller J.F., 1995. Genotypic Variation in Kernel Cadmium Concentration in Sunflower Germplasm under Varying Soil-Conditions. *Crop Science* 35 (1), 137-141.
- McLaughlin M.J., Singh B., 1999. Cadmium in soils and plants. Kluwer Academic Publishers.
- Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L., Lazzaro I., Spliid N., Justenen A., 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual Fusarium species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76, 234-240.
- Robert M., 1995. Le sol, une interface dans l'environnement: les grands types de pollution mettant en cause le sol. *Sciences*, 95 (1), 23-29.
- Sappin-Didier V., Brayette S., Jadé C., Baize D., Masson P., Mench M., 2002. Phytodisponibilité du cadmium pour le blé. Rôles des paramètres pédologiques et agronomiques. In : Baisez D. et Tercé M. (Eds). *Les éléments traces dans les sols* ; INRA Editions, pp. 481-504.
- Smolders E., 2001. Cadmium uptake by plants. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 14 (2), 177-183
- Veron-Delor G., 2007. Mycotoxines fusariennes des céréales, Arcachon, 11-13 septembre 2007.

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



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

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