



l'institut Agro
agriculture • alimentation • environnement



UNIVERSITÉ DE NANTES



Mémoire de Fin d'Etudes

Master 2 Mention Biologie Végétale (BV)
Parcours : Gestion de la Santé des Plantes

Année universitaire 2019-2020

Amélioration d'une méthode de détection dite par « grow-out » de *Peronospora valerianellae* sur semences de *Valerianella locusta*

Par : Léa MANDELLI

Soutenu à Angers le : 9 septembre 2020

Maître de stage : Geoffrey ORGEUR

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Léa Mandelli,
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :



Remerciements

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de pathologie du GEVES pour son accueil.

Merci à tous d'avoir toujours répondu à mes questions et d'avoir été aussi chaleureux.

Continuez comme ça, vous êtes la meilleure team de tout le GEVES.

Un merci spécial à l'équipe de myco, que j'ai dérangé peut-être un peu trop souvent.

Merci à Isabelle, pour m'avoir donné de magnifiques sourires chaque matin.

Merci à Corinne, avec qui on aurait dit le sud, et qui m'a toujours accompagné avec le sourire.

Merci à Elsa pour m'avoir fait confiance pour la garde de son chat.

Merci à Agathe, pour ces petites discussions vraiment sympas.

Merci à Valérie, pour avoir été une responsable de labo au top et pour m'avoir aidée et soutenue dans ma recherche de thèse.

Merci à Alina, ma chère collègue de l'université avec qui il est toujours agréable de passer la pause du midi.

Merci à Isabelle, pour toutes ces histoires racontées autour d'un thé, pour ces grandes discussions sur le monde (et la généalogie), pour la culture que nous avons partagée. Cela va beaucoup me manquer.

Et pour finir, merci à Geoffrey, pour avoir été un maître de stage génial, pour m'avoir soutenu dans ma recherche de thèse, pour les quasiment trois heures que tu as passé à me briefer pour mon entretien, pour cet appel téléphonique décisif et pour ton immense gentillesse.

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Structure d'accueil	1
1.2. Le couple hôte/agent pathogène	2
1.2.1. La mâche, <i>Valerianella locusta</i>	2
1.2.1. <i>Peronospora valerianellae</i>	5
1.3. Analyse sanitaire des semences	9
1.3.1. Objectifs et intérêts.....	9
1.3.2. Structures et méthodes de référence	9
1.4. Problématique et objectifs du stage	11
2. Matériel et méthodes.....	12
2.1. Obtention et caractérisation du matériel biologique	12
2.2. Essais de standardisation de la méthode de détection par « grow-out ».....	13
2.2.1. Etude de l'effet de la température et du volume d'eau.....	13
2.2.2. Etude de l'impact de la densité de semis.....	14
2.2.3. Etude de l'impact de la dormance	15
2.3. Essais de validation	15
2.3.1. Limite de détection.....	15
2.3.2. Spécificité analytique	16
2.4. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle	16
2.5. Statistiques.....	18
3. Résultats.....	19
3.1. Essai de caractérisation et limite de détection	19
3.2. Essais de standardisation	20
3.2.1. Température et volume d'eau.....	20
3.2.2. Densité de semis	21
3.2.3. Dormance	21
3.3. Spécificité analytique	22
3.4. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle	22
4. Discussion	23
4.1. Standardisation de la méthode	23
4.1.1. Température et volume d'eau.....	23
4.1.2. Densité de semis	24
4.1.3. Dormance	24

4.2. Essais de validation	25
4.2.1. Limite de détection.....	25
4.2.2. Spécificité analytique	26
4.3. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle	26
5. Conclusions et perspectives	27
6. Références.....	28
6.1. Bibliographie	28
6.2. Sitographie.....	30

Glossaire

Dormance : « La dormance des semences pourrait être considérée simplement comme un obstacle à l'achèvement de la germination d'une semence viable intacte dans des conditions favorables »

(traduction d'une définition issue de l'article écrit par Finch-Savage et Leubner-Metzger (2006) intitulé « Seed dormancy and the control of germination. » paru dans *New phytologist*, 171(3), 501-523.

Liste des abréviations

CSNV	Corn Salad Necrosis Virus
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
GEVES	Groupe d'Etude des Variétés et des Semences
GIP	Groupement d'Intérêt Public
GNIS	Groupement National Interprofessionnel des Semences
INRAe	Institut National de Recherche en Agriculture, alimentation et environnement
ISF	International Seed Federation
ISHI-Veg	International Seed Health Initiative for Vegetable crops
ISTA	International Seed Testing Association
LED	Light-Emitting Diode
LNR	Laboratoire National de Référence
MAA	Ministère en charge de l'Agriculture
OCCV	Office Communautaire des Variétés Végétales
PMG	Poids Mille Grains
RAPD-PCR	Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
SNES	Station Nationale d'Essais de Semences
SEV	Secteur d'Etude des Variétés
UPOV	Union internationale pour la Protection des Obtentions Végétales

Liste des Annexes

Annexe I : résultats des analyses statistiques réalisées lors du stage

Table des figures

Figure 1 : Locaux du GEVES situés à Beaucouzé (GEVES.fr).....	1
Figure 2 : Emile Schribiaux (Calaméo.com).....	1
Figure 3 : Plante de mâche ((chambre-agriculture.fr).....	2
Figure 4 : Arbre phylogénétique des espèces appartenant à la famille des Valerianaceae. (Hidalgo et al., 2004).....	3
Figure 5 : Première taxonomie attribuée au mildiou de la mâche issue de « <i>Fungi Rhenani Exsiccati</i> » (Braun and Bensch, 2019)	5
Figure 6 : Extrait d'un arbre phylogénétique généré avec la méthode du maximum de ressemblance. (Göker et al., 2009).....	5
Figure 7 : cycle biologique d'un organisme du genre <i>Peronospora</i> (Kandel et al., 2019).....	6
Figure 8 : Plantule de mâche présentant un enroulement des jeunes feuilles et des sporangiophores de <i>Peronospora valerianellae</i> (GEVES, 2020).....	6
Figure 9 : Oospores de mildiou de la mâche observés au microscope optique avec un grossissement x10 après un lavage des semences de mâche (GEVES).....	7
Figure 10 : Résultats préliminaires des taux de germination des lots de semences de mâche du semencier 1	12
Figure 11 : Terrine de 30cmx30cm remplie de terreau SNES où 6 rangs ont été tracés dans lesquels ont été semés aléatoirement 400 semences.	12
Figure 12 : Plateau utilisé lors des différents essais où l'eau est versée.	13
Figure 13 : Centrale d'acquisition SA32 d'AOIP.	13
Figure 14 : Exemple de traitement d'image réalisé avec le logiciel ImageJ dans le but de mesurer l'aire foliaire.	13
Figure 15 : Schéma de l'empreinte de 400 trous.....	14
Figure 16 : Echantillon de l'empreinte de la Figure 15. A gauche, des photos du prototype de 9 trous ; à droite, un aperçu du résultat obtenu sur les terrines de terreau.	14
Figure 17 : Tête de comptage de 100 pores avec des semences de mâche retenues grâce à l'aspiration de l'air.	14
Figure 18 : Schéma des procédures utilisés pour déterminer le choix des tests statistiques....	18
Figure 19 : Ensemble de diagrammes bâtons illustrant les résultats de l'essai de caractérisation des lots et de l'essai « limite de détection »	19
Figure 20 : Ensemble des représentations graphiques des résultats de l'étude de l'impact du volume d'eau et de la lumière.	20
Figure 21 : Ensemble de diagrammes bâtons illustrant les résultats de l'étude de l'impact de la densité de semis.	21
Figure 22 : Ensemble des diagrammes bâtons illustrant les résultats de l'étude de l'impact de la dormance..	21
Figure 23 : clichés semis de plantules de mâche réalisés 21 jour après le semis dans le cadre de la détermination de la spécificité analytique de la méthode de détection.	22

Table des tableaux

Tableau I : Principaux agents pathogène, foliaires et du sol, détectés en Italie sur des légumes feuilles cultivés pour le secteur du « prêt à manger ». (Gullino et al., 2019)	4
Tableau II : Races physiologiques de <i>Peronospora valerianellae</i> associées aux variétés de mâche sensibles ou résistantes (Pietrick and Zinkernagel, 2002).	5
Tableau III : Résultats préliminaires des taux de contamination des lots de semences de mâche du semencier 1	12
Tableau IV : Modalités de l'étude de l'effet de la température et du volume d'eau sur la méthode de détection par « grow-out ».	13
Tableau V : Lots utilisés lors de l'étude de l'impact de la densité de semis sur la méthode de détection par « grow-out ».	14
Tableau VI : Détail des résultats obtenus pour l'essai de détermination de la limite de détection de la méthode.....	19
Tableau VII : Résumé des conclusions des essais de standardisation décrits dans le rapport.....	27



Figure 1 : Locaux du GEVES situés à Beaucozé (GEVES.fr).

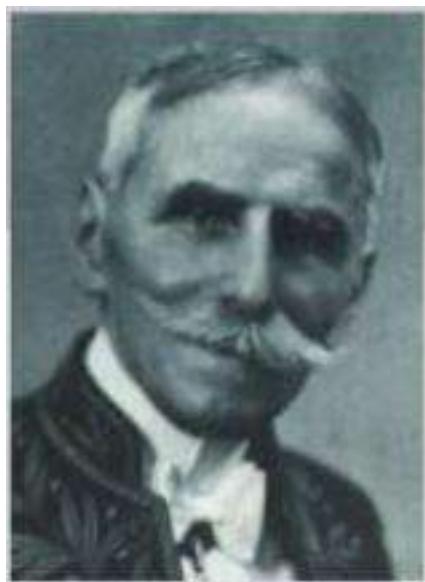


Figure 2 : Emile Schribiaux (Calaméo.com).

1. Introduction

1.1. Structure d'accueil

Le GEVES (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences) fut créé en 1971 au sein de l'INRA (aujourd'hui INRAe) dans le département de génétique et amélioration des plantes (Figure 1). C'est en 1989 que le groupe devient un GIP (Groupement d'Intérêt Public) et est administré par L'INRAe (Institut National de Recherche en Agriculture, alimentation et environnement), le MAA (Ministère en charge de l'Agriculture) et le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences). Trois secteurs techniques sont regroupés au GEVES. Le premier est la SEV (Secteur d'Etudes des Variétés). Ce secteur est chargé des études des variétés pour l'inscription au catalogue et pour la protection des obtentions végétales et du contrôle variétal. Le second secteur est appelé le BioGEVES (anciennement le laboratoire de biochimie du GEVES du site INRA du Magneraud). Ce secteur est chargé des analyses de biologie moléculaire et biochimique des variétés et des semences. Le troisième et dernier secteur est la SNES (Station Nationale d'Essais de Semences) qui fut créé en 1884 par l'agronome français, Émile Schribiaux (Figure 2), dans le but de contrôler la qualité des semences (ce qui est toujours le cas de nos jours). La station a été rattachée au GEVES lors de sa création en 1971. Ses domaines d'expertise sont l'analyse de la qualité des semences en vue d'une certification ou d'une commercialisation nationale et/ou internationale. C'est à ce secteur technique qu'est rattaché le laboratoire de pathologie des semences du GEVES dans lequel s'est déroulé ce stage. Ce pôle a comme missions d'évaluer la qualité sanitaire des semences, d'évaluer la résistance variétale, de décrire des pathosystèmes, de gérer des essais inter-laboratoires, de participer et de coordonner des projets de recherche, de mettre au point et optimiser les méthodes d'analyse et d'animer des formations et des visites. En 2009, le GEVES a obtenu la certification selon la norme ISO 9001 (management de la qualité) et en 2017 la SNES a obtenu la dénomination LNR (Laboratoire National de Référence). De ce fait, les laboratoires au sein de la SNES sont officiellement reconnus pour la qualité de leurs analyses et leur capacité à fournir des résultats et des méthodes de références. C'est pourquoi le laboratoire de pathologie des semences est fréquemment sollicité par des organisations responsables de l'élaboration et de la standardisation des méthodes d'analyses à l'échelle internationale, telles que l'ISTA (International Seed Testing Association), l'ISHI-Veg (International Seed Health Initiative for Vegetable Crops), l'UPOV (Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales), l'OCVV (Office Communautaire des Variétés Végétales) et l'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (www.geves.fr)



Figure 3 : Plante de mâche ((chambre-agriculture.fr)).

1.2. Le couple hôte/agent pathogène

1.2.1. La mâche, *Valerianella locusta*

1.2.1.1. Description générale

La mâche, dont le nom d'espèce est *Valerianella locusta*, ou encore *Valerianella olitoria*, qui pousse spontanément en période hivernale à l'état sauvage, est une espèce cultivée en Europe depuis le milieu du XVII^e siècle (Figure 3). Elle est également présente sur les sols africains, américains du nord et asiatiques tempérés. Cette plante annuelle maraîchère est reconnaissable à sa rosette de feuilles sessiles de forme allongée et spatulée (Vilmorin Andrieux, 1904 ; Bois Désiré, 1927). Doucette, bourse, clairette, raiponce et valériane sont quelques-uns de ses noms vernaculaires. Elle est présente dans la culture populaire à travers le conte des frères Grimm, Raiponce, publié en 1812. Cette plante est appréciée pour ses qualités organoleptiques et sa composition en molécules d'intérêt. Il a été montré que la mâche possède des effets anti tumoraux (Ramos-Bueno *et al.*, 2016) et contient 3 fois plus de composés phénoliques que le brocoli ainsi qu'une activité antioxydante 22 fois plus élevée que ce dernier (Parente *et al.*, 2013). Or, cette culture, dont les plantes sont consommées en salade, est très exigeante et seulement 10% de parcelle contenant des défauts peut être autorisé, ce qui inclut la contamination par les agents pathogènes susceptibles de provoquer des symptômes sur les plants de mâches (www.inao.gouv.fr). Au-delà de ce seuil, la culture doit être détruite (www.inao.gouv.fr ; Champion 1997). C'est pourquoi des analyses sanitaires sont nécessaires pour éviter les pertes. Ces analyses interviennent dès la production des semences jusqu'au conditionnement (ahdb.org.uk).

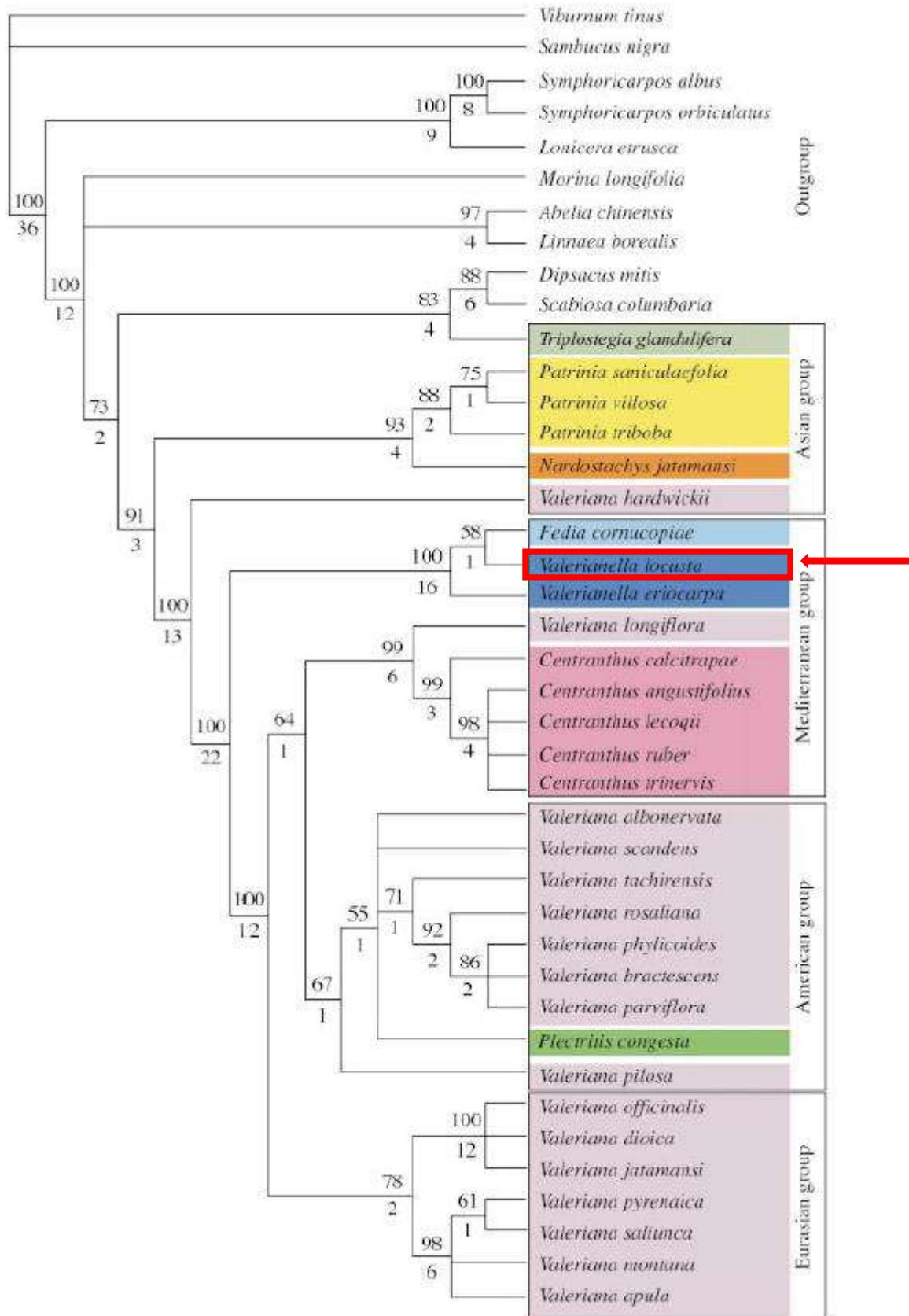


Figure 4 : Arbre phylogénétique des espèces appartenant à la famille des Valerianaceae. Il s'agit d'un arbre « strict consensus » composé lui-même de huit arbres « maximum de parcimonie » générés par la matrice matK. Les numéros sur les branches représentent les valeurs du bootstrap et les nombres sous les branches indiquent l'indice de Bremer. (Hidalgo et al., 2004)

1.2.1.1. Taxonomie

La dénomination linéenne *Valerianella locusta* a été attribuée à la mâche par Jean-François Laterrade, un botaniste bordelais du XIXe siècle dans un ouvrage de 1821 traitant de la flore des environs de Bordeaux. La mâche est une plante dicotylédone annuelle de l'ordre des *Dispacales*, de la famille des *Caprifoliaceae*, et appartenant au genre *Valerianella* qui comprend environ 180 espèces végétales différentes (The Royal Botanic Garden 2003). Les espèces les plus proches de cette plante dans l'arbre phylogénétique des *Valerianaceae* sont la corne d'abondance (*Fedia cornucopiae*) et la valérianelle à fruits velus (*Valerianella eriocarpa*), deux plantes non cultivées (Figure 4). D'un point de vue génétique, la mâche est diploïde avec $2n = 14$ chromosomes avec une reproduction autogame. Les résistances aux maladies et/ou à la chaleur peuvent être des critères recherchés en sélection variétale (Muminovic *et al.*, 2004).

1.2.1.2. Culture

La mâche est une culture hivernale. En effet, les températures idéales pour cette plante oscillent entre 5 et 15°C. Cependant, des innovations telles que la culture sous serre et hors sol, permettent la production de mâche hors saison (Nicola *et al.*, 2014/2016). L'itinéraire de culture classique en plein champ ou sous tunnel peut se résumer par des semis entre août et novembre et des récoltes s'étalant d'octobre à mars de l'année suivante (chambre-agriculture.fr). La brièveté de ce cycle de culture est un des avantages de la doucette. Une autre qualité de la mâche est le fait qu'elle soit considérée comme une culture propre (Znidarčič *et al.*, 2008) car elle nécessite peu de fertilisation et les traitements phytosanitaires ont lieu en amont des semis, lors de la préparation du sol (généralement par fumigation). En raison de la densité des plants dans les parcelles cultivées et de leur fragilité, une intervention mécanique, comme le désherbage, en cours de culture est inenvisageable. Une intervention chimique ciblée et raisonnée sera à privilégier (www.fnams.fr).

1.2.1.3. Le marché de la mâche

C'est en France et en Allemagne que la mâche est la plus populaire. Dans le reste du monde, la mâche est une culture mineure. Sur le territoire germanique, elle est la troisième culture légumière sous serres après la tomate et le concombre (Muminovic *et al.*, 2004). Mais c'est la France qui domine le marché mondial avec la détention de 75% de la production mondiale. Cette production française se concentrerait, pour 90% de celle-ci, dans le bassin nantais dans les années 90 (Péron and Rees, 1998), contre 86% en 2012 (draaf.pays-de-la-loire.agriculture.gouv.fr).

Tableau 1 : Principaux agents pathogène, foliaires et du sol, détectés en Italie sur des légumes feuilles cultivés pour le secteur du « prêt à manger ». (Gullino et al., 2019)

Table 1. Main foliar and soil-borne pathogens detected in Italy on leafy vegetables grown for the ready-to-eat sector (updated from Gullino et al. 2014a)

Host	Species	Pathogen	Year of detection
Cultivated rocket	<i>Eruca vesicaria</i>	<i>Alternaria japonica</i>	2010
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>raphani</i>	2003
		<i>Fusarium equiseti</i>	2011
		<i>Colletotrichum kahawae</i>	2014
Wild rocket	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>raphani</i>	2003
		<i>Rhizoctonia solani</i>	2004
		<i>Alternaria japonica</i>	2010
		<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	2012
		<i>Fusarium equiseti</i>	2014
		<i>Albifimbria verrucaria</i>	2015
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	2002
Lettuce	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allophoma tropica</i>	2011
		<i>Fusarium equiseti</i>	2014
		<i>Pythium</i> Cluster B2a (<i>P. dissotocum</i> , <i>P. coloratum</i> , <i>P. diclinum</i> , <i>P. cf. dictyosporum</i> , <i>P. lutarium</i> , <i>P. sp.</i> 'Group F' and <i>P. sp.</i> <i>tumidum</i>)	2015
		<i>Pythium sylvaticum</i>	2015
		<i>Fusarium oxysporum</i> ff. spp. <i>raphani</i> and <i>conglutinans</i>	2004
		<i>Rhizoctonia solani</i>	2004
Lamb's lettuce	<i>Valerianella olitoria</i>	<i>Pythium irregularare</i>	2013
		<i>Phoma valerianellae</i>	1966
		<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	2014
		<i>Paramyrothecium roridum</i>	2015
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>basilici</i>	1989
		<i>Peronospora belbahrii</i>	2003
		<i>Alternaria alternata</i>	2010
Swiss chard	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	<i>Pleospora betae</i>	2007
		<i>Pythium aphanidermatum</i>	2010
Spinach	<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>	2011
		<i>Pythium aphanidermatum</i>	2014
		<i>Albifimbria verrucaria</i>	2015
		<i>Stemphylium beticola</i>	2017
		<i>Alternaria alternata</i>	2017

En 2018, 7748 hectares (environ deux fois la superficie d'Angers) étaient dédiés à la culture de la mâche en France et produisaient 40728 tonnes de mâche (agreste.agriculture.gouv.fr). Cela représente environ 49 millions d'euros de marge directe pour les producteurs (la chambre d'agriculture de la Provence estime qu'un hectare rapporte 6359 euros de marge directe aux producteurs). Cependant, cette production est un peu plus faible que celle enregistrée pour l'année 2015 avec 43229 tonnes de mâche (agreste.agriculture.gouv.fr). Cela s'explique par des surfaces allouées à la mâche légèrement plus petites et un rendement un peu moins important (agreste.agriculture.gouv.fr).

1.2.1.4. Les principales maladies sur mâche

L'intérêt pour les agents pathogènes des légumes à feuilles est relativement récent (Gullino *et al.*, 2019), la majorité d'entre eux ayant été caractérisés après l'année 2000 (Tableau I). Les agents pathogènes peuvent être fongiques, bactériens ou viraux. Les mauvaises herbes ne sont pas des maladies à proprement parler mais font partie des organismes vivants pouvant nuire au bon développement de la mâche. Au stade plantule, la mâche peut être confondue avec certaines de ces adventices. C'est notamment le cas avec l'épilobe tétragone. Dans le cadre d'une agriculture raisonnée, des moyens sont mis en place pour cibler spécifiquement les plantes nuisibles pour réduire l'utilisation d'herbicides. L'imagerie spectrale semble être un outil prometteur pour discriminer les « mauvaises herbes » de la mâche (Strothmann *et al.*, 2017).

Une des bactéries pathogènes de la mâche est *Acidovorax valerianellae*, identifié en 2003, responsable de l'apparition de taches bactériennes observées depuis 1991 (Gardan *et al.*, 2003). Au niveau viral, le « corn salad necrosis virus » (CSNV) peut être cité en exemple. Il s'agit d'un agent pathogène émergeant provoquant des nécroses sur jeunes plantes (Verdin *et al.*, 2018). Concernant les maladies fongiques de la mâche, *Phoma valerianellae* est un agent pathogène problématique observé depuis 1967 causant une réduction drastique des capacités germinatives par la mort des embryons (fonte de semis) et noircissant les semences (Nathaniels, 1985). Une autre maladie fongique problématique pour *Valerianella locusta* est l'agent du mildiou de la mâche connu sous le nom de *Peronospora valerianellae* qui est transmissible *via* les semences et peut se disperser au champ grâce au vent après sporulation (Lang-Yona *et al.*, 2018). C'est pourquoi des analyses sanitaires sur semences sont importantes (Grimault, 2015).

35.

Peronospora Valerianellae Eckl.

Caespitibus floccosis, laxis, albidis; hyphis erectis, dichotomo-ramosis, ramis ultimis subaequalibus, rectis, rectangulare-patentibus; sporidiis obovatis.
Ad V. carinatae folia, rarissime. Vere. Ca. Hostric iam.

Figure 5 : Première taxonomie attribuée au mildiou de la mâche issue de « *Fungi Rhenani Exsiccati* » (*Peronospora valerianellae* Fuckel, *Fungi Rhen. Exs.*, *Fasc. 1: no. 35, 1863* [*Hedwigia 2(15): 132, 1863*] in (Braun and Bensch, 2019).

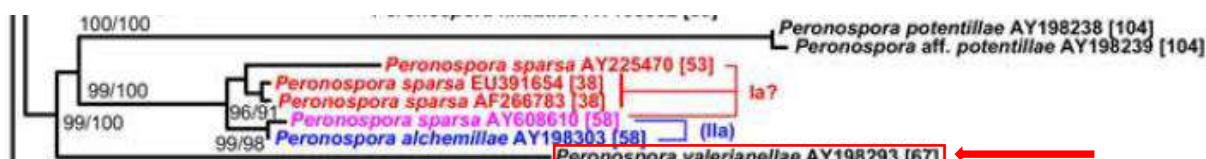


Figure 6 : Extrait d'un arbre phylogénétique généré avec la méthode du maximum de ressemblance. Les nombres en dessous et au-dessus des branches représentent les scores de ressemblance obtenus à partir de 100 répétitions. Les numéros associés aux noms d'espèces sont des accessions Genbank. (Göker et al., 2009).

Tableau II : Races physiologiques de *Peronospora valerianellae* associées aux variétés de mâche sensibles ou résistantes (Pietrick and Zinkernagel, 2002).

Cultivar/Line	Isolate				
	V-1/V-2		G/H-1/H-2/TG	L	DV
	1	2	3	4	5
'Gala'	–	+	–	–	+
'J-2'	–	(+)	–	–	+
'Verte de Cambrai'	+	(+)	–	+	+
'J-6'	+	(+)	+	+	+
'Louviers'	–	–	+	+	+
'70'	–	+	–	–	–

+ susceptible (DI 5-9), – resistant (DI 1), (+) incomplete resistant (DI 1,1-4,9)

1.2.1. *Peronospora valerianellae*

1.2.1.1. *Description générale*

Peronospora valerianellae fut pour la première fois décrit en 1863 par K. W. G. L. Fuckel, un botaniste allemand spécialisé dans l'étude des champignons, dans un traité taxonomique des maladies de plantes intitulé « *Fungi Rhenani Exsiccati* » (Figure 5). Le mildiou de la mâche est considéré comme une des maladies les plus problématiques pour cette culture. En effet, cet organisme partage les mêmes conditions climatiques optimales de développement que la mâche, à savoir, des températures fraîches et une hygrométrie proche de 100% (Pietrek and Zinkernagel, 2002).

1.2.1.2. *Taxonomie*

Peronospora valerianellae est un organisme appartenant à la classe des Oomycètes. Il est de ce fait un pseudochampignon et est phylogénétiquement plus proche des algues que des champignons. Le genre *Peronospora* comprend environ 500 espèces qui sont toutes des organismes biotrophes. Ce sont des parasites obligatoires, avec spectre d'hôte très étroit, qui ont nécessairement besoin d'un hôte vivant pour se développer. Ce genre est associé aux différents mildious avec une production de conidies colorées (Thines and Choi, 2016). La dénomination linnéenne de ce pseudochampignon datant de 1863 est toujours celle reconnue et utilisée de nos jours (Braun and Bensch, 2019). Les espèces les plus proches sur l'arbre phyllogénétique du genre *Peronospora* sont *Peronospora potentillae* (mildiou de la potentille), *Peronospora sparsa* (mildiou du rosier) et *Peronospora alchemillae* (mildiou de l'alchémille commune) (Figure 6). Il semble qu'il existe cinq races physiologiques du mildiou de la mâche (Tableau II) qui ont été déterminées avec la méthode RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) (pietrek et Zinkernagel, 2002).

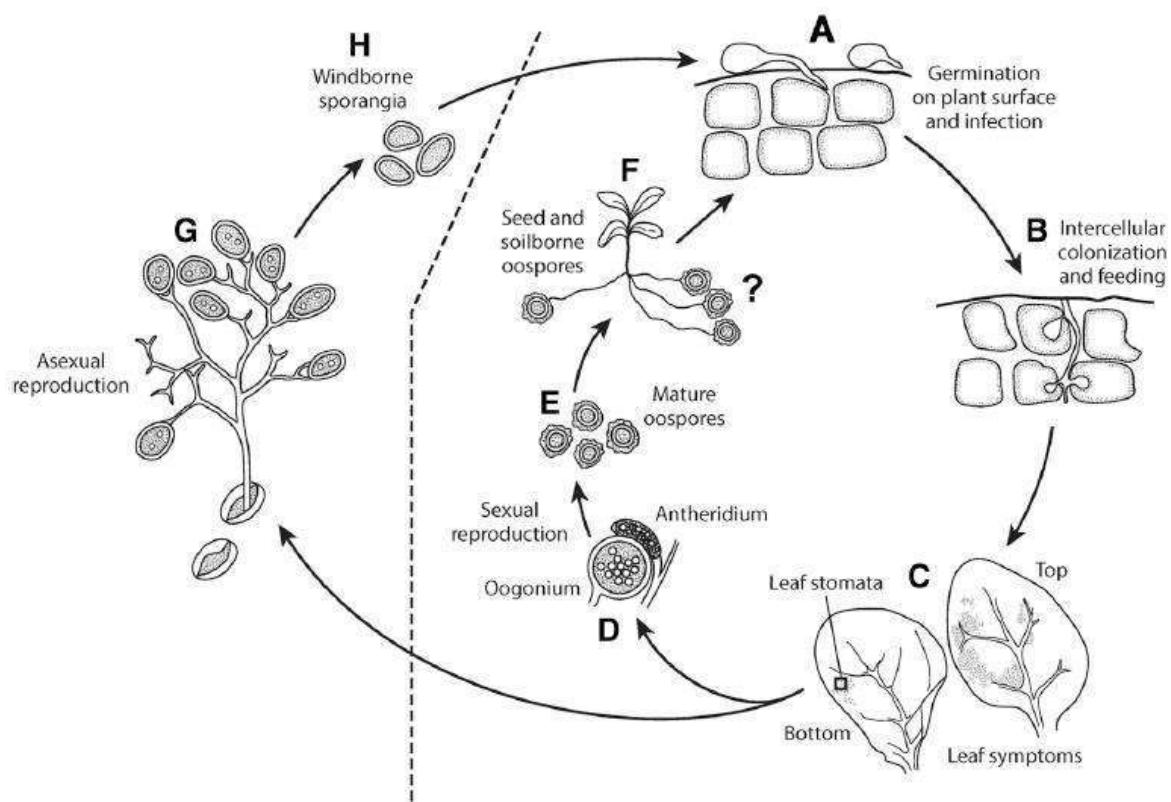


Figure 7 : cycle biologique d'un organisme du genre *Peronospora* (Kandel et al., 2019).



Figure 8 : Plantule de mâche présentant un enroulement des jeunes feuilles et des sporangiophores de *Peronospora valerianellae* (GEVES, 2020).

1.2.1.1. Cycle biologique

Comme *Peronospora valerianellae* est un Oomycète, son cycle de reproduction est diplobiontique, c'est-à-dire qu'il y a multiplication végétative lors de la phase diploïde. Concernant son cycle de vie, le mildiou de la mâche passe par un cycle de reproduction sexué (forme téléomorphe) et un cycle de reproduction asexué (forme anamorphe) (Figure 7). La reproduction sexuée se déroule à partir d'anthéridies et d'oogones qui sont produites sur les plants infectés de mâche. Cela aboutit à la formation d'oospores qui sont capables d'adhérer aux semences et forment l'inoculum primaire (Montes-Borrego *et al.*, 2009). Quand les semences germent et donnent de jeunes plantules, les oospores, de couleur jaune-brun, germent à leur tour et forment un appareil sucoir qui permet au champignon de prélever les nutriments dont il a besoin au détriment de la plantule. Des sporangiophores peuvent alors être formés sur les plantules, qui contiennent des sporanges, et sont à l'origine de la reproduction asexuée (Kandel *et al.*, 2019). Ces sporangiophores de couleur blanche émergent en général des stomates des jeunes plants infectés et possèdent une morphologie dichotomique.

1.2.1.2. Symptômes

Les symptômes pouvant être causés par cette maladie cryptogamique sont des taches foliaires vert clair sur la face adaxiale (tournée vers la tige) qui plus tard vireront au jaune, puis au marron avant de former une tache nécrotique. Cependant, les symptômes les plus communs sont l'apparition de sporangiophores sur la face abaxiale des feuilles (Figure 8). Un enroulement des feuilles peut également être observé à la suite de l'infection de la mâche par le mildiou (Koike, 2008). Un feutrage de couleur violette peut être observé sur la face inférieure des jeunes feuilles qui est principalement constitué de conidies (Champion, 1997). Étant un organisme biotrophe, *Peronospora valerianellae* a besoin d'un hôte vivant. La mort des jeunes plantules n'est donc jamais observée (Spring *et al.*, 2018).

1.2.1.3. Dissémination

Comme ses homologues du genre *Peronospora*, le mildiou de la mâche peut être véhiculé par les vents lorsqu'il est sous la forme de spores. L'eau est également un vecteur majeur de cet agent pathogène, notamment avec le « splashing ». Ce « splashing » résulte d'une projection des spores *via* les éclaboussures qui surviennent généralement lors des épisodes de pluie (Lang-Yona *et al.*, 2018).

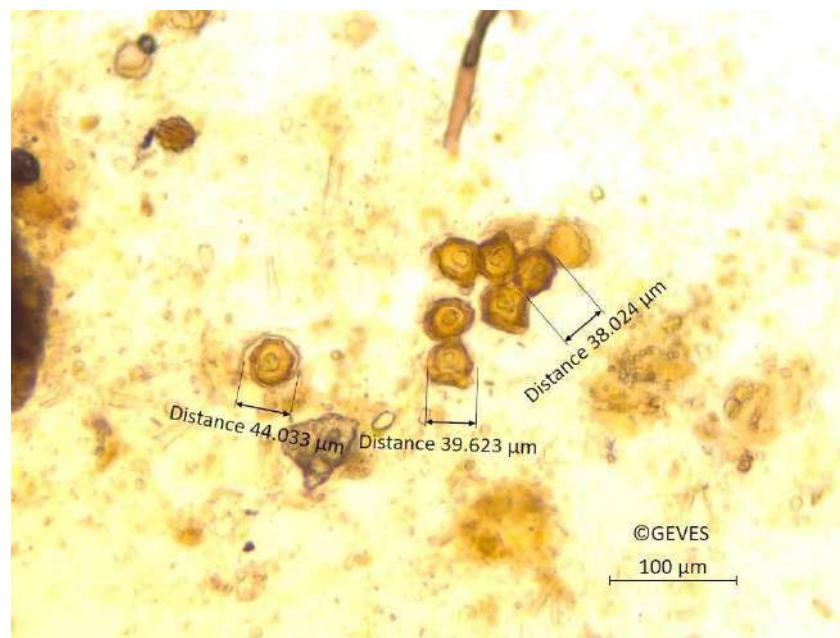


Figure 9 : Oospores de mildiou de la mâche observés au microscope optique avec un grossissement x10 après un lavage des semences de mâche (GEVES).

1.2.1.1. Méthode de détection

En raison de l'ampleur que peut prendre une infection par le mildiou sur mâche et du pourcentage de maladie autorisé relativement bas, il est nécessaire de mettre en œuvre des moyens de détection et de lutte. La détection de *Peronospora valerianellae* au niveau des semences peut se faire de diverses manières. Une première méthode utilise la technique dite par « lavage des semences ». Elle consiste à faire tremper un échantillon de semences dans de l'eau osmosée, puis après quelques passages au vortex et à la centrifugeuse, l'eau de rinçage est analysée sous microscope afin de déterminer s'il y a présence ou non d'oospores, la forme du mildiou présente sur les semences. Ces oospores ont une forme ronde et une couleur légèrement brunâtre (Figure 9). La méthode de détection dite par technique « grow out » consiste à semer des semences en conditions climatiques favorables à la transmission de la maladie de la semence à la plantule. Dans le cas de la mâche et du mildiou de la mâche, une température à 12°C avec une hygrométrie avoisinant les 100% sont les conditions idéales pour cette méthode d'analyse. Après 21 jours d'incubation en module climatique, une observation est réalisée pour voir si oui, ou non, il y a présence de sporangiophores sur les cotylédons au stade jeune plantule. Ces formes conidiennes du pseudo-champignon ont une couleur blanche et une forme de Y avec une division dichotomique caractéristiques et apparaissent généralement après l'enroulement des premières feuilles sur elles-mêmes (Figure 8). La PCR et la qPCR sont deux méthodes moléculaires qui peuvent également être employées dans le cadre de la détection (Schena *et al.*, 2013) avec cependant de potentielles difficultés au niveau de l'extraction d'ADN à cause des polyphénols et des polysaccharides. L'avantage de la méthode par grow-out est l'information sur la viabilité de l'agent pathogène. Aucun sporangiophore ne sera visible si le mildiou n'est pas viable, contrairement à la méthode par lavage ou par PCR pour lesquelles un résultat positif sera obtenu même si le champignon n'est pas vivant (et donc incapable de générer des symptômes).

1.2.1.2. Moyens de lutte

Si un résultat positif est obtenu à l'issu de ces divers tests, une élimination de l'agent pathogène ou du lot de semences devra être effectuée. Au champ, des moyens conventionnels peuvent être employés par le biais de produits phytopharmaceutiques tel que l'Orvego® (BASF). Cependant, ces méthodes conventionnelles sont remises en causes, avec notamment des incidents comme celui impliquant le métam sodium ayant provoqué l'intoxication d'ouvriers agricole et de riverains à Brain-sur-l'Authion en octobre 2018 (www.ouest-france.fr). Du côté des méthodes alternatives, Herforth *et al.* (2017) ont pu constater qu'un traitement à base d'éliciteur et d'extrait de peau d'orange (un antifongique d'origine naturelle) permettait d'inhiber l'apparition d'une infection à la suite d'une inoculation de *Peronospora valerianellae* sur des plantules de mâche. Des traitements peuvent être appliqués dès le stade semence. L'hypochlorite de sodium est généralement employé et donne de bons résultats contre le mildiou de la mâche (Schärer *et al.*, 2017). Cette molécule est cependant prohibée en agriculture biologique. L'utilisation de l'eau chaude ou de la vapeur aérée (« aerated steam ») semblent être des méthodes alternatives prometteuses (Schärer *et al.*, 2017 ; Bazzocchi *et al.*, 2017).

1.3. Analyse sanitaire des semences

1.3.1. Objectifs et intérêts

Environ 90% de la nourriture générée par l'agriculture trouve dans les semences (Neergaard, 1977). Elles sont donc essentielles pour l'espèce humaine. Or, les graines sont aussi un vecteur privilégié par bon nombre d'agents pathogènes. Dans l'intérêt des semenciers mais aussi des cultivateurs, des analyses permettant de vérifier si les semences sont vierges de tout agent pathogène sont réalisées. Des tests sur semences sont donc officiellement réalisés en France par la SNES, fondée en 1884 par Émile Schribiaux qui avait pour devise « telle semence, telle récolte » (Gallais, 2018). Il est à noter que les analyses officielles des semences ont été mises en place bien avant la création d'un groupement interprofessionnel. Celui-ci ne sera créé qu'en 1941 par le régime de Vichy pour faire face aux problèmes générés par les conflits faisant alors rage à l'époque et sera nommé le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences) (Bonneuil et Thomas, 2012). Aujourd'hui, La France est le premier producteur européen de semences et le troisième à l'échelle du monde. En 2016, selon un rapport du GNIS, 246 entreprises semencières se trouvaient sur le sol français avec un chiffre d'affaire de 3,33 milliards d'euros. L'enjeu économique est donc important. Les analyses sanitaires des semences sont donc une étape importante dans le processus de production des semences, et nécessaires pour que le commerce international des semences ne soit pas un vecteur de maladies (Grimault, 2015).

1.3.2. Structures et méthodes de référence

Depuis bientôt une centaine d'année, des organismes de références tel que l'ISTA génèrent des méthodes standards dans un souci d'homogénéité et de fiabilité des analyses sur semences afin de favoriser les échanges commerciaux, de garantir la qualité des lots et d'instaurer un climat de confiance entre les différents acteurs de la filière (Aveling, 2014).

1.3.2.1. ISHI-Veg

L'ISF (International Seed Federation) est une organisation non gouvernementale créée en 1924 partageant les mêmes objectifs que le GEVES, à savoir le développement de la filière semence, mais à l'échelle internationale. La partie dédiée à la qualité sanitaire des semences au sein de l'ISF, créée en 1993, est nommée ISHI-Veg. Son rôle consiste à élaborer et à harmoniser des méthodes d'analyses sanitaires des semences, à mettre en relation les divers acteurs de la filière semence afin de faciliter la collaboration et à superviser des essais inter-laboratoires. Ce sont ces essais qui permettent de valider de nouvelles méthodes et de les éléver au rang de protocoles standards.

C'est pour le compte de cette entité que les essais de ce stage ont été réalisés. En effet, au sein du laboratoire de pathologie de la SNES, des agents font partie de groupes d'études de ISHI-Veg, dont font également partie des agents d'autres groupes d'essais sur semences nationaux des autres pays européens (ex : Naktuinbouw, Pays-Bas).

1.3.2.2. Mise au point de méthodes standards

Dans le domaine des analyses sanitaires des semences, si aucune méthode standard n'est disponible, différents cas de figures peuvent se présenter : soit il n'existe aucune méthode, soit il existe des méthodes non standards, soit il existe une méthode standard rendue obsolète. Pour être considérée comme standard, une méthode d'analyse doit avoir été validée pour s'assurer qu'elle remplit différents critères. Il faut, dans un premier temps, évaluer les besoins, c'est-à-dire déterminer si une méthode est nécessaire pour une espèce végétale ou un agent pathogène. Il faut ensuite répertorier les différentes méthodes utilisées dans les divers centres d'analyses et laboratoires dans le monde. Une première concertation a alors lieu entre les différents représentants des organismes participants. Dans le cas du mildiou de la mâche sur semences, il existe diverses méthodes d'analyse, mais aucune n'est considérée comme officielle. Dans ce cas, le consortium des représentants doit décider quelle serait la meilleure méthode pouvant être élevée au rang de méthode de référence. Ensuite, lorsqu'une méthode est identifiée comme potentielle méthode standard, des étapes d'optimisation et de validation doivent être réalisées. L'étape d'optimisation consiste à déterminer quels sont les critères de performances à prendre en compte pour réaliser la méthode. Par critères de performance, il faut comprendre des paramètres permettant d'obtenir des résultats répétables (sur un même lot avec le même opérateur dans les mêmes conditions) et reproductibles (différents lots par différents opérateurs) avec une sensibilité diagnostique (correspondant au seuil de détection) et une spécificité diagnostique (consiste à détecter l'agent pathogène ciblé et de le différencier avec les autres) en accord avec celle prédictes (www.worldseed.org). Les phases d'optimisation permettent de générer des résultats qui feront office de résultats de référence pour les essais inter-laboratoires qui peuvent aboutir à une validation de la méthode comme méthode de référence (seedtest.org).

1.4. Problématique et objectifs du stage

L'objectif de ce stage a été de réaliser l'étape d'optimisation de la méthode de détection par « grow-out », retenue comme potentielle méthode standard de détection de *Peronospora valerianellae*, et de réfléchir aux étapes de validation de cette méthode, pour le compte d'ISHI-veg. Le GEVES s'est positionné comme « Project lead » pour cet agent pathogène. Il doit assurer les essais de comparaison, l'évaluation des critères de performances, l'organisation du circuit de validation et la rédaction du rapport d'analyse du circuit. Cette méthode par grow-out est utilisée au sein du GEVES pour des analyses de routine pour le compte des semenciers. Cet agent pathogène pouvant provoquer de lourds dégâts sur les cultures de mâche, il est important pour les compagnies semencières, comme pour les producteurs, d'avoir des semences vierges du mildiou. Obtenir une méthode de détection optimisée pouvant être déployée dans la majorité des laboratoires d'analyses des semences et capable de détecter *Peronospora valerianellae*, même en faible quantité dans les lots, est l'objectif recherché par la structure ISHI-Veg et le GEVES, et était aussi le but de ce stage. L'obtention de lots auprès des semenciers était la première étape. Ces lots, après caractérisation, ont été utilisés pour les phases d'optimisation de la méthode de détection par « grow-out ». Différents facteurs pouvant être modifiés ont été identifiés et testés comme le volume d'eau et la densité de semis afin de déterminer les meilleurs paramètres pour cette méthode. L'impact de la dormance et des températures a pu également être évalué. Les premiers essais de validation de la méthode, à savoir ceux concernant l'évaluation du seuil de détection et l'évaluation de la spécificité analytique, ont pu être réalisés. En parallèle de ces tests d'optimisation et de validation, la production d'oospores a été tentée pour pallier le problème de la disponibilité de matériel biologique pour les essais.

Tableau III : Résultats préliminaires des taux de contamination des lots de semences de mâche du semencier 1

Lots	Taux de contamination par <i>Peronospora valerianellae</i> (%)
1	0%
2	2,5%
3	0,25%
4	1%
5	0%
6	0,25%
7	0%
8	1%
9	0%
10	0%

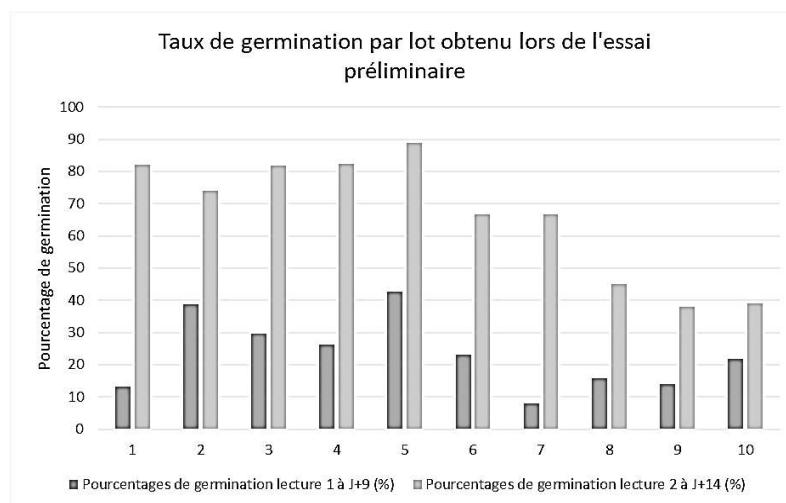


Figure 10 : Résultats préliminaires des taux de germination des lots de semences de mâche du semencier 1



Figure 11 : Terrine de 30cmx30cm remplie de terreau SNES où 6 rangs ont été tracés dans lesquels ont été semés aléatoirement 400 semences.

2. Matériel et méthodes

2.1. Obtention et caractérisation du matériel biologique

Une des tâches à effectuer dans le cadre de ce travail était de trouver du matériel biologique exploitable pour les essais, c'est-à-dire des semences infectées par *Peronospora valerianellae*. Des recherches au sein même du GEVES ont été réalisées et des demandes à des semenciers ont été envoyées. Des lots ont été envoyés par le semencier 1. Afin de pouvoir utiliser ces lots pour les essais, une caractérisation a été réalisée. Une caractérisation consiste à évaluer précisément le taux de contamination d'un lot de semences. Un essai préliminaire, (à raison d'une répétition de 400 semences par lot), synthétisé dans le Tableau III et la Figure 10, a été mis en place dans le but de déterminer si les lots envoyés étaient infectés par *Peronospora valerianellae*. A l'issu de celui-ci les lots 2, 3 et 4 ont été sélectionnés pour l'essai de caractérisation.

L'essai de caractérisation consistait en huit répétitions pour chaque lot, en accord avec le plan de validation rédigé par l'ISHI-Veg. Chaque répétition correspondait à un échantillon de 400 semences, ce dernier étant préparé à l'aide d'une balance et du PMG (Poids Mille Grains) des lots deux jours avant le semis.

Les échantillons ont été semés dans des terrines 30cmx30cm (un échantillon par terrine) contenant du terreau SNES non étuvé (préparé avec 1 sac de terreau (semis mini-mottes prêt à l'emploi) de « 70 litres » et 1 caisse de 20 litres de sable de rivière). Dans chaque terrine, 6 rangs ont été creusés et les graines y ont été semées (semis en rang, cf Figure 11). Ce protocole est celui utilisé par l'équipe d'analyse sanitaire de mycologie du laboratoire de pathologie des semences de la SNES. Les terrines ont ensuite été placées de façon randomisée à raison de deux terrines par plateau. Ensuite, 1200mL ont été versés dans chaque fond de plateau (ce qui fait 600mL par terrine). Des capots ont été placés sur chaque terrine pour en isoler le contenu et les plateaux ont été disposés sur des chariots. Ces chariots ont ensuite été placés dans un module climatique à 12°C avec 12h de lumière et 12h d'obscurité.

La méthode décrite dans le paragraphe ci-dessus sera également employée dans les essais décrits ci-dessous.

Des lectures de germination par comptage du nombre de plantules levées ont été faites à J+14 (J+0 étant le jour de semis) et des lectures de symptômes ont eu lieu à J+21 par recherche de symptômes typiques (feuilles enroulées et/ou sporangiophores blancs).

Tableau IV : Modalités de l'étude de l'effet de la température et du volume d'eau sur la méthode de détection par « grow-out ».

Modalité	Volume d'eau	Nombres de répétitions
1	600mL	3
2	700mL	3
3	800mL	3



Figure 12 : Plateau utilisé lors des différents essais où l'eau est versée.



Figure 13 : Centrale d'acquisition SA32 d'AOIP.

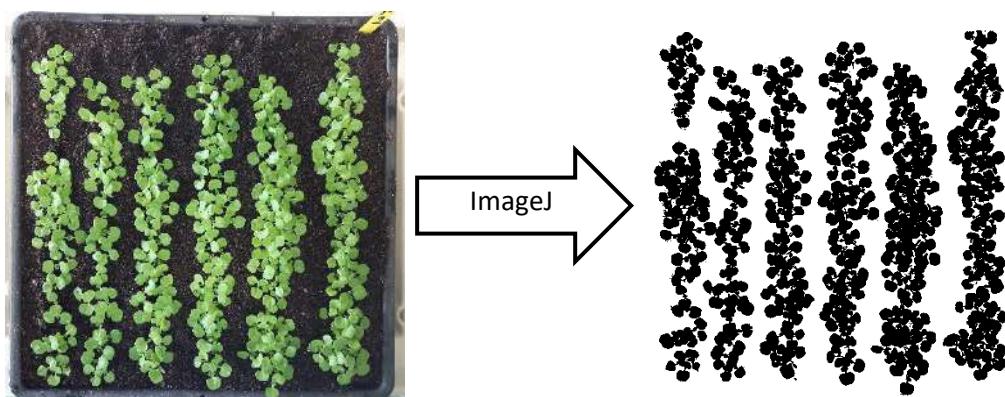


Figure 14 : Exemple de traitement d'image réalisé avec le logiciel ImageJ dans le but de mesurer l'aire foliaire.

2.2. Essais de standardisation de la méthode de détection par « grow-out »

2.2.1. Etude de l'effet de la température et du volume d'eau

Lors des phases d'optimisation, la question du volume d'eau et des températures au sein des terrines a été soulevée. Un essai a alors été mis en place afin de déterminer quel volume d'eau était le plus favorable pour le développement des plantules de mâche. Dans un second temps, ce facteur a également été étudié afin de voir si le volume d'eau impactait, ou non, sur la température au sein des terrines capotées. Pour ce faire, trois modalités ont été définies avec pour chacune trois répétitions (Tableau IV). Un seul et même lot de semences saines de mâche (les lots infectés par le mildiou de la mâche n'étant pas disponibles au moment de l'essai), provenant du semencier 1, a été utilisé pour cet essai. A J+0, les 9 échantillons de 400 semences ont été semés dans 9 terrines 30cmx30cm et traités selon la méthode décrite dans la partie 2.1 de ce rapport. Lorsqu'une terrine était seule dans un plateau, le volume d'eau de la modalité associé y a été ajouté deux fois, pour que l'eau puisse atteindre le fond des terrines (les plateaux présentant des fentes, cf figure 12). De J+3 à J+5, des relevés de températures ont été effectués au sein de chaque terrine capotée avec une centrale d'acquisition SA32 (AOIP) couplée au logiciel Visulog à laquelle étaient reliées des sondes de températures (Figure 13). La température globale du module (à l'extérieur des terrines) a également été relevée *via* les relevés automatiques réalisés par le logiciel de supervision et de contrôle des modules climatiques de la SNES. A J+10 et J+14, des lectures de germination (nombre de plantules/nombre de graines semées) ont été effectuées. A J+21 des photos en vue du dessus ont été prises afin de calculer une aire foliaire totale pour chaque terrine à l'aide du logiciel ImageJ. Toutes les images ont été traitées de la même façon. En premier lieu, une échelle a été définie en utilisant les dimensions des terrines (carrés de 30cmx30cm). Les images ont ensuite été converties au format 8-bit (plantules noires et fond blanc) (Figure 14) et le « bruit » présent en arrière-plan a été effacé. L'aire définie par l'ensemble des plantules (autrement dit, la surface foliaire totale) pour chaque image a ensuite été mesurée automatiquement grâce au logiciel (la valeur obtenue correspond à la surface totale des parties noires de l'image, donc des plantules). Le laboratoire de pathologie de la SNES prévoit d'installer des néons LED (Light-Emitting Diode), dans ses modules climatiques. C'est dans cette perspective qu'un second essai a été reconduit à l'identique mais uniquement avec les modalités « 700mL/terrine » et « 800mL/terrine » à raison de 4 répétitions. Le but de cet essai était de pouvoir comparer les résultats obtenus avec des néons halogènes *vs* des néons LED.

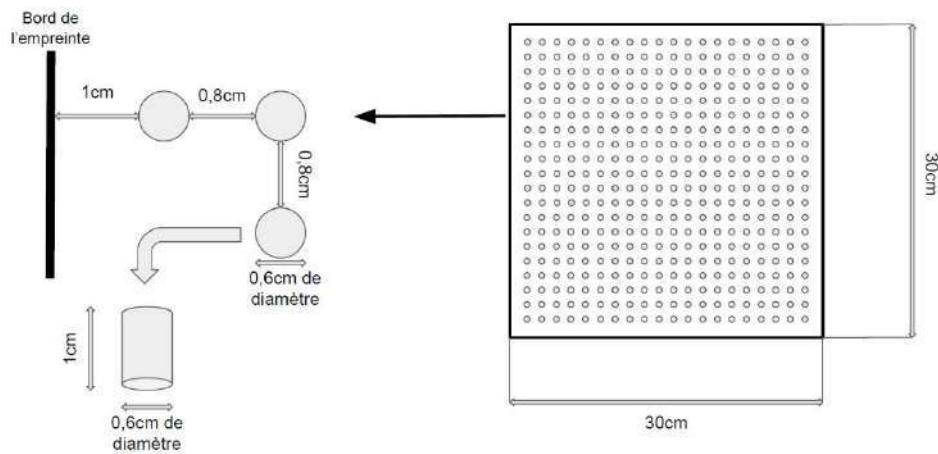


Figure 15 : Schéma de l'empreinte de 400 trous.



Figure 16 : Echantillon de l'empreinte de la Figure 15. A gauche, des photos du prototype de 9 trous ; à droite, un aperçu du résultat obtenu sur les terrines de terreau.

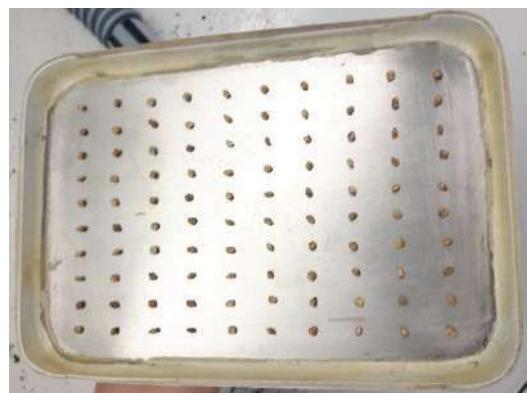


Figure 17 : Tête de comptage de 100 pores avec des semences de mâche retenues grâce à l'aspiration de l'air.

Tableau V : Lots utilisés lors de l'étude de l'impact de la densité de semis sur la méthode de détection par « grow-out ».

Lots	Taux de contamination par <i>Peronospora valerianellae</i>
X	3%
Y	5%

2.2.2. Etude de l'impact de la densité de semis

La densité de semis a été pointée, lors de ce stage, comme un paramètre à standardiser. Cette densité est liée à la technique de semis employée. Au sein du laboratoire de pathologie de la SNES, pour la méthode de détection par « grow-out », c'est un semis en rang qui est pratiqué. Le semis en rang consiste à tracer, dans une terrine 30cmx30cm remplie de terreau, 6 rangs et à y répartir 400 semences aléatoirement entre les rangs. Un des problèmes identifiés avec cette technique est le risque de contamination croisée dû au chevauchement des plantules, et donc de surévaluation du taux de contamination, à cause de la densité de semis au sein de chaque rang. Cette densité peut également générer des difficultés à la lecture ce qui accroît risque de passer à côté d'une plantule contaminée.

Un essai a été mis en place pour comparer la technique de semis en rang à deux autres techniques (semis avec empreinte et semis à l'aide d'une tête de comptage) pouvant potentiellement la remplacer.

Un semis avec une empreinte consiste à utiliser un outil permettant de creuser des trous où semer, puis à disposer une semence dans chacun des emplacements creusés. Pour cette modalité, une empreinte de 400 trous avait été imaginée (Figure 15). Cependant, elle n'a pas pu être fabriquée. Un prototype permettant de creuser 9 trous à la fois (avec les mêmes caractéristiques que celle de 400) a été fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D (Figure 16).

Un semis à l'aide d'une tête de comptage consiste à utiliser un dispositif branché sur un robinet relié au circuit du vide d'air. Ceci va permettre d'aspirer les semences qui vont venir se positionner sur les pores de la plaque de la tête de comptage (Figure 17). Pour disposer les semences accrochées à cet outil sur les terrines, un piston fixé à la tête permet d'arrêter le flux d'air ce qui permet de relâcher les semences. Pour cet essai, une tête de comptage avec 100 pores a été utilisée. Concernant les semences, deux lots de semences de mâche, provenant du semencier 3 avec des taux de contaminations déterminés par ce dernier (Tableau V), ont été employés.

Pour chaque technique de semis, trois terrines par lot ont été semées. Cela représente dix-huit échantillons de 400 semences. Les semis ont été réalisés avec les trois techniques décrites ci-dessus et une fois semées, les terrines ont été traitées comme décrit dans la partie 2.1 de ce rapport. Une lecture de germination a eu lieu à J+14 (J+0 étant le jour du semis) et une lecture de symptômes a eu lieu à J+21.

2.2.3. Etude de l'impact de la dormance

Un essai a été réalisé afin de voir l'impact de la dormance sur la méthode de détection de *P. valerianellae* par « grow-out ».

Trois lots dormants, A, B et C, ne contenant pas *Peronospora valerianellae* et provenant du semencier 1, ont été analysés. Pour chacun de ces lots, deux modalités ont été expérimentées, « dormance conservée » et « dormance levée », avec trois répétitions pour chacune. Cela représentait un total de 18 échantillons de 400 semences analysés.

Pour la modalité « dormance conservée », aucune manipulation particulière n'a été effectuée avant le semis. Pour la modalité « dormance levée », à J-1 (J+0 étant le jour du semis), les échantillons ciblés ont été individuellement disposés dans des piluliers. Une solution avec 0,05% de gibberelline a été versée dans chaque pot. Cette hormone végétale est impliquée dans les mécanismes de levée de la dormance en stimulant la germination (Hilhorst et Karssen, 1992). Les piluliers ont été disposés pendant 24h dans un module climatique à 12°C. A J+0, ces échantillons ont été égouttés, puis placées sur des buvards. Les semis et le traitement des terrines ont été réalisés selon la méthode décrite dans la partie 2.1. Des lectures de germination ont été réalisées à J+7 et J+14 et des photos, en vue de réaliser des calculs d'aires foliaires avec le logiciel imageJ, ont été prises à J+21.

2.3. Essais de validation

Lors de ce stage, les premières phases de validation de la méthode de détection ont pu être réalisées. La sensibilité analytique (ou limite de détection) et la spécificité analytique sont les deux critères de performance qui ont pu être testés au sein du laboratoire de pathologie de la SNES (le « Project lead » du projet de validation de cette méthode de détection par « grow-out »).

2.3.1. Limite de détection

D'après la définition issue de la procédure de validation des méthodes de l'ISTA (seedtest.org), la limite de détection d'une méthode consiste en la plus petite quantité de l'agent pathogène cible qui puisse être détectée dans un échantillon de semences par la méthode d'analyse.

Pour cet essai, ce sont les lots de semences caractérisés lors de l'essai de caractérisation décrit plus haut qui ont été utilisés. Pour chacun de ces lots, 4 terrines 30cmx30cm contenant du terreau étuvé ont été semées.

Cela représente douze échantillons de 400 semences qui ont été traités comme décrit dans la partie 2.1.. Des lectures de germination à J+14 et des lectures de symptômes à J+21 ont été réalisées.

2.3.2. Spécificité analytique

La spécificité analytique est, selon la définition issue de la procédure des validations des méthodes de l'ISTA, la capacité d'un test à détecter l'agent pathogène cible tout en le différenciant des non-cibles. En amont de cet essai, il avait été déterminé par le groupe de travail d'ISHI-Veg que les symptômes causés par *Peronospora valerianellae* sur les cotylédons de mâche, avec cette méthode d'analyse dite « grow-out », sont typiques et peuvent difficilement être confondus avec ceux d'autres agents pathogènes. Ces symptômes sont caractérisés par des enroulements des cotylédons en direction de la tige qui peuvent être combinés à la présence de sporangiophores blancs. Au cours des différents essais décrits plus haut, la spécificité analytique a été déterminée par des observations combinées à des prises de clichés représentant les symptômes typiques afin d'en définir toutes leurs caractéristiques. Des photos de « non-symptômes » ont également été prises afin de les comparer aux vrais symptômes.

2.4. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle

Lors de ce stage, l'obtention d'échantillons de semences contaminées uniquement par *Peronospora valerianellae* a été une étape limitante dans le processus d'optimisation du protocole de détection par grow-out. C'est dans ce contexte qu'est apparue l'idée de produire des oospores en laboratoire en vue de réaliser de la contamination artificielle sur semences de mâche.

Au sein du GEVES deux isolats sont cultivées, PV1 (MAT/REF/04-13-01-01-03) et PV2 (MAT/REF/04-13-01-02-05), toutes deux détectées et isolées de lots de semences de mâche d'une compagnie semencière en 2009. En parallèle, deux variétés de mâches sont utilisées pour la conservation, la Verte de Cambrai et la Gala. La première est sensible à PV1 et résistante à PV2, la seconde est résistante à PV1 et sensible à PV2. A J-21 (J+0 étant le jour de l'inoculation) deux terrines 30cmx30cm remplies de terreau ont été semées avec les deux variétés de mâche. Les terrines ont été ensuite placées pendant 21 jours dans un module à 20°C avec 12h de lumière et 12h de nuit. A J+0, trente feuilles de Verte de Cambrai et trente feuilles de Gala ont été prélevées et mélangées à 15ml d'eau osmosée. Ce mélange a ensuite été filtré pour éliminer les résidus végétaux. Ce filtrat, contenant les sporangiophores des isolats PV1 et PV2, constituait l'inoculum. A l'aide d'un dispositif relié à un flux d'air, l'inoculum a été pulvérisé sur les jeunes plantules de

mâche. Une fois les terrines inoculées, celle-ci ont été disposées dans un module climatique à 12°C avec 12h de lumière et 12h d'obscurité. A J+10 et à J+17, des analyses, inspirées de celles décrites par Pavón *et al.* (2008), ont réalisées pour détecter ou non la présence d'oospores. Pour ce faire, 10 feuilles et 10 cuillères de terreau de chaque terrine ont été prélevées aléatoirement. Ces 4 échantillons ont été mis dans des erlenmeyer contenant 100mL de solution de lavage (500mL d'eau du robinet et 2 gouttes de Tween 20). Les erlenmeyers ont ensuite été disposés sur une table d'agitation pendant 15 minutes à 150rpm. Chaque solution a été filtrée à travers des filtres de 250µm, puis de 60µm et enfin de 20µm. Les résidus capturés dans le filtre de 20µm ont été re-suspendus dans des tubes de 50ml avec de l'eau osmosée. En ce qui concerne les deux échantillons de sol, des étapes supplémentaires ont été réalisées afin de limiter la présence de résidus de terreau pour faciliter les futures observations microscopiques.

Ces échantillons ont été centrifugés pendant 4 minutes à 900xg ($g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$). Le surnageant a été jeté et le culot re-suspendu dans 30ml d'une solution de saccharose d'une concentration de 1,6M. Ces suspensions ont été centrifugées pendant 45 secondes à 190xg ($g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$). Le surnageant obtenu a été filtré à travers d'un filtre de 20µm. Les débris retenus dans le filtre ont été re-suspendus dans de l'eau osmosée dans des tubes de 50mL et ces nouveaux tubes ont été centrifugés à nouveau à 900xg ($g = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$) pendant 4 minutes. Le surnageant a été transféré dans un autre tube de 50ml et le culot a été re-suspendu dans 1ml d'eau osmosée.

Les quatre tubes obtenus à partir des quatre échantillons de feuilles et de terreau ont été stockés dans un module climatique à 20°C à l'obscurité. Pour les analyses au microscope optique, des préparations sur lames concaves pour chaque échantillon ont été réalisées à raison d'un dépôt de 100µL par concavité. Les observations ont été effectuées avec un grossissement X10.

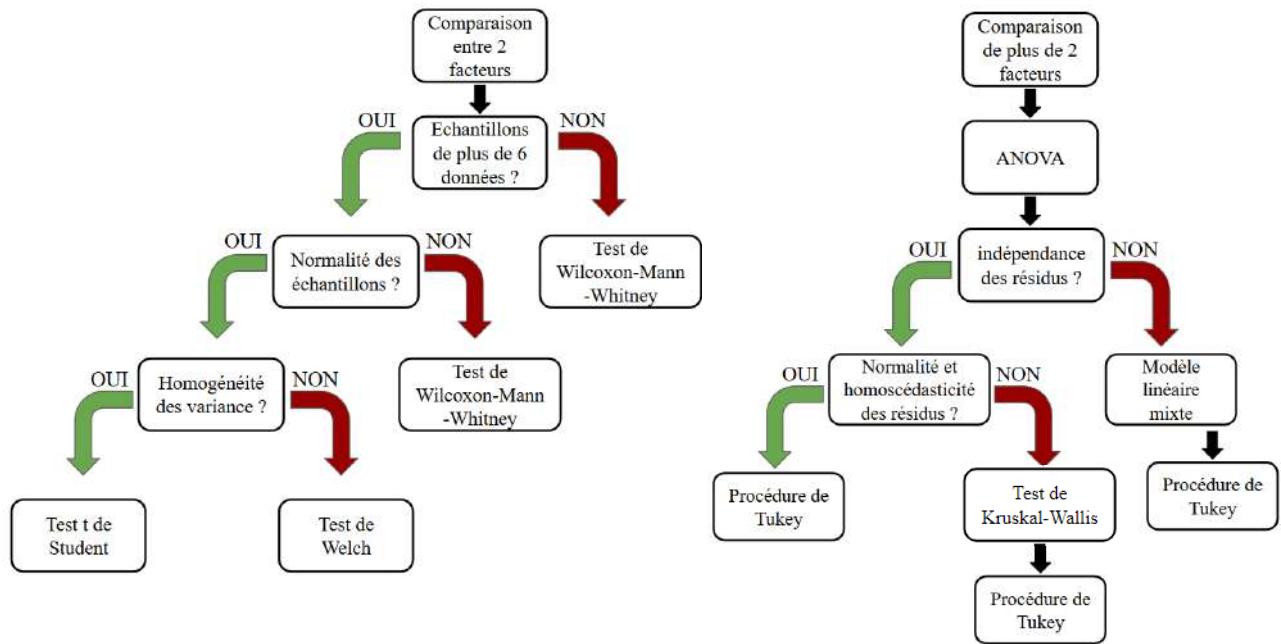


Figure 18 : Schéma des procédures utilisés pour déterminer le choix des tests statistiques.

2.5. Statistiques

Les données numériques issues des essais décrits dans les parties ci-dessus ont toutes été rentrées dans un tableur en vue d'analyses statistiques sur le logiciel R, en suivant les conseils de mise en forme des données prodigués par Broman & Woo (2018).

Concernant le choix des tests statistiques, pour les comparaisons entre deux facteurs, si les effectifs étaient inférieurs à 6 individus statistiques, c'est le test de Wilcoxon-Mann-Whitney qui a été employé. Si les effectifs étaient supérieurs à 6, la normalité de la distribution et l'homoscédasticité (homogénéité des variances) ont été testées dans cet ordre respectivement à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk et d'un « F test ». Si la normalité n'était pas vérifiée, c'est un test de Wilcoxon-Mann-Whitney qui a été réalisé. Si elle était vérifiée mais que ce n'était pas le cas de l'homoscédasticité, un test de Welch a été fait. Dans le cas où normalité et homoscédasticité étaient vérifiées, un test t de Student était appliqué aux données.

Dans le cas des comparaisons entre plus de deux facteurs, une ANOVA a été réalisée. L'indépendance des résidus, la normalité de leur distribution ainsi que leur homoscédasticité ont été vérifiées dans cet ordre avec, respectivement, le test de Durbin-Watson, le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett. Si toutes les hypothèses étaient vérifiées, ce sont les résultats de l'ANOVA qui étaient utilisés. Dans le cas de non-indépendance des résidus, un modèle linéaire mixte a été réalisé. Lorsque la normalité et/ou l'homoscédasticité des résidus n'étaient pas avérées, un test de Kruskal-Wallis a été employé. Dans le cas de l'ANOVA, du test de Kruskal-Wallis et du modèle linéaire mixte, une comparaison de toutes les moyennes deux à deux a été faite avec la procédure de Tukey. Les choix des tests statistiques sont synthétisés dans la Figure 18.

Concernant les représentations graphiques, des diagrammes bâtons et des « pirate plots » ont été utilisés pour représenter visuellement les résultats obtenus. La représentation « pirate plot » permet de visualiser la moyenne, grâce à une barre horizontale, mais aussi la dispersion et la densité des données mesurées grâce à un « violon ». La hauteur du « violon » représente la dispersion des données et sa largeur représente la densité des données pour une valeur donnée sur l'axe des ordonnées.

Les résultats obtenus avec le logiciel R pour toutes les analyses statistiques décrites dans ce rapport sont regroupés dans l'annexe I.

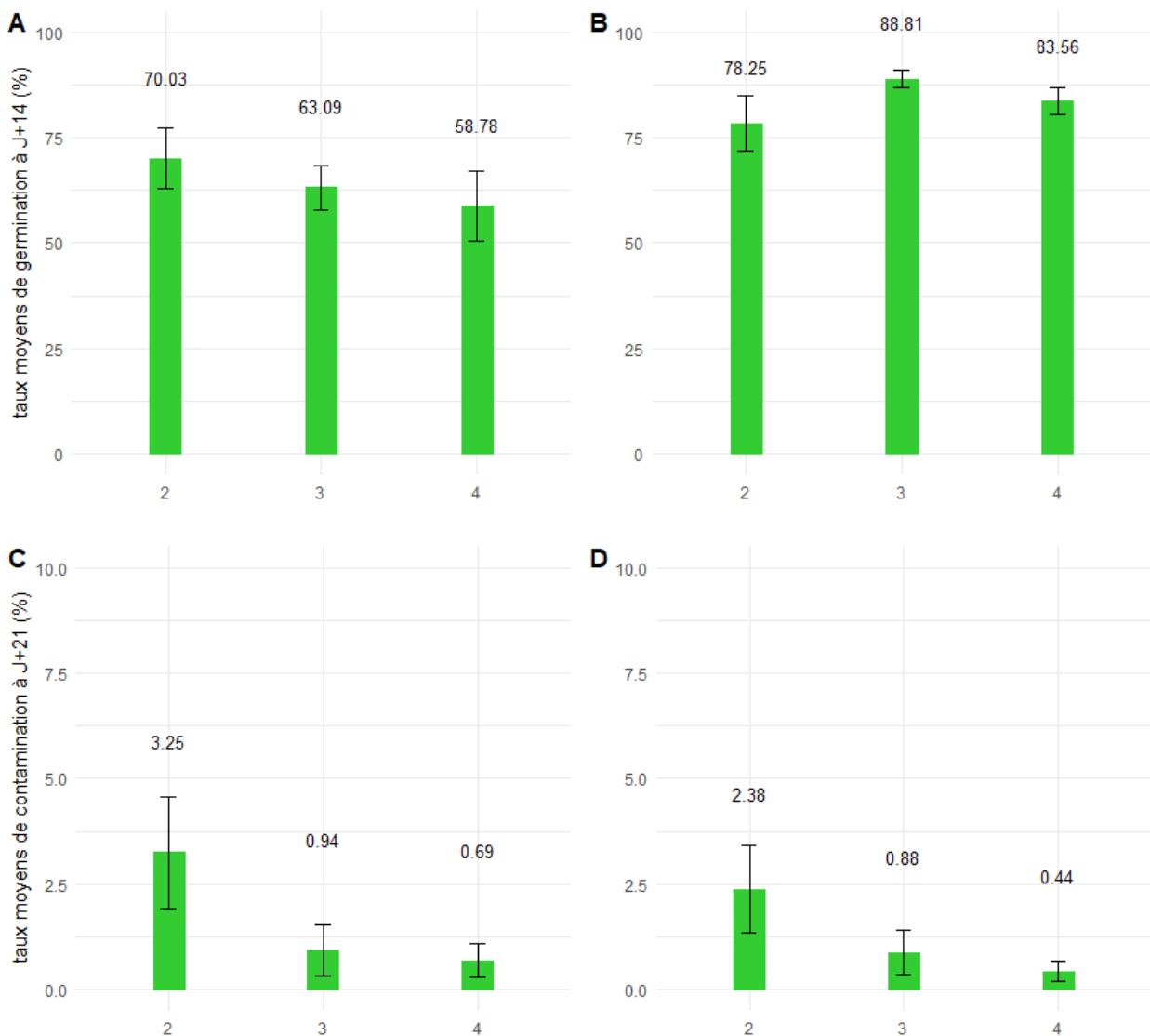


Figure 19 : Ensemble de diagrammes bâtons illustrant les résultats de l'essai de caractérisation des lots et de l'essai « limite de détection » ; « 2 », « 3 » et « 4 » correspondent aux numéros des lots utilisés. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. A : taux moyens de germination de l'essai de caractérisation ; B : taux moyens de germination de l'essai « limite de détection » ; C : taux moyens de contamination de l'essai de caractérisation ; D : taux moyens de contamination de l'essai « limite de détection ».

Tableau VI : Détail des résultats obtenus pour l'essai de détermination de la limite de détection de la méthode

	Nombre de plantules contaminées par <i>Peronospora valerianellae</i>			
	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Répétition 4
Lot 2	13/400	7/400	5/400	13/400
Lot 3	1/400	4/400	3/400	6/400
Lot 4	1/400	3/400	2/400	1/400

3. Résultats

3.1. Essai de caractérisation et limite de détection

L'essai de caractérisation couplé à celui de détermination de la limite de détection ont, tous les deux, été réalisés dans le cadre des essais de validation de la méthode de détection par « grow-out » de *Peronospora valerianellae* sur semences de mâche. Les résultats issus de ces études n'ont pas été soumis à des tests statistiques car le but était de déterminer la limite de détection qui correspond au plus petit pourcentage de contamination dont toutes les répétitions se sont révélées positives pour la présence du mildiou de la mâche (selon le plan de validation rédigé par le groupe de travail d'ISHI-Veg).

Les résultats de ces deux essais sont synthétisés dans la Figure 19. La caractérisation, basée sur les moyennes des huit répétitions de chaque lot, a permis de déterminer des taux de germination de 70,3%, 63,09% et 58,78% et des taux de contamination de 3,25%, 0,94% et 0,69% pour les lots 2, 3 et 4 respectivement. Lors de l'essai « limite de détection », toutes les répétitions de tous les lots se sont avérées positives lors des lectures à J+21, comme montré dans le Tableau VI. La limite de détection du mildiou de la mâche par la méthode « grow-out » est donc de 0,69%. Il s'agit du plus petit taux de contamination par l'agent pathogène cible pour lequel toutes les répétitions sont positives.

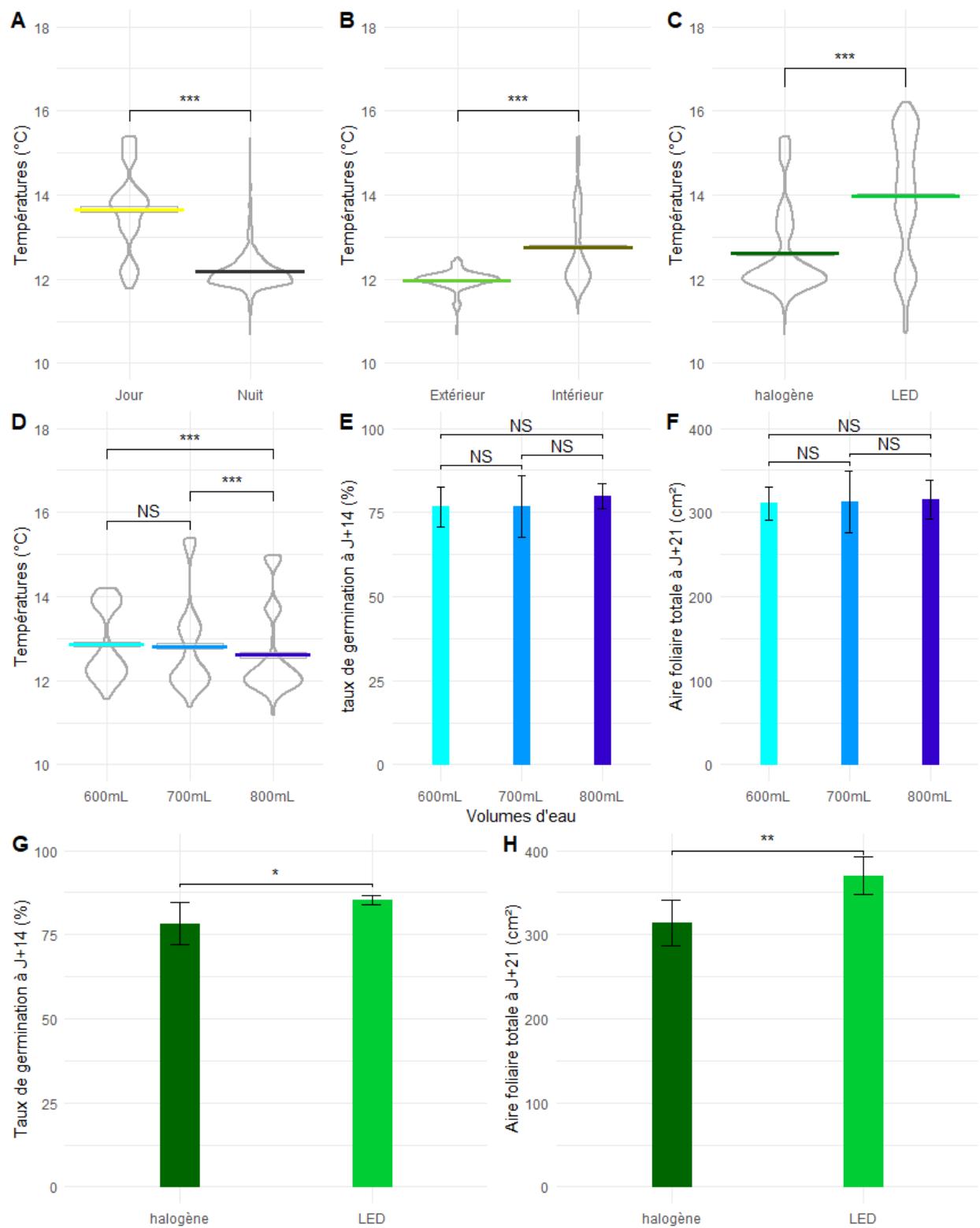


Figure 20 : Ensemble des représentations graphiques des résultats de l'étude de l'impact du volume d'eau et de la lumière. $pvalue > 0,05 \rightarrow \text{NS}$; $pvalue > 0,01 \rightarrow *$; $pvalue > 0,001 \rightarrow **$; $pvalue < 0,001 \rightarrow ***$. Des barres d'erreur constituées des écarts-types sont présentes dans les diagrammes bâtons. A : pirateplot des températures relevées lors des phases de jour et des phases de nuit toutes modalités confondues ; B : pirateplot des températures relevées à l'extérieur et à l'intérieur des terrines ; C : pirateplot des températures relevées lors des essais sous néons halogènes et sous LED ; D : pirateplot des températures relevées entre les différentes modalités de volumes d'eau. E : diagramme bâtons des taux de germination des différentes modalités de volumes d'eau ; F : diagramme bâtons des aires foliaires totales des différentes modalités de volumes d'eau ; G : diagramme bâtons des taux de germination pour les différents types d'éclairage ; H : diagramme bâtons des aires foliaires pour les différents types d'éclairage.

3.2. Essais de standardisation

3.2.1. Température et volume d'eau

Tous les résultats de cette étude sont synthétisés dans la Figure 20 ci-contre.

Concernant les paramètres, autre que le volume d'eau, à l'origine de variations de température, les « pirate plots » A, B et C montrent respectivement la différence entre le « jour » (lumières allumées) et la « nuit » (lumières éteintes), la différence entre la température à l'intérieur des terrines capotées et l'extérieur (tout en étant à l'intérieur du module) et la différence entre les températures relevées sous les néons halogène et celles sous relevées LED. Pour le facteur « jour », toutes modalités de volume d'eau confondues, une moyenne de 13,7°C a été calculée qui est significativement plus élevée (test de Wilcoxon-Mann-Whitney ; pvalue < 2,2e-16) que celle calculée pour le facteur « nuit » qui est de 12,2°C (Figure 20, « pirate plot » A). La température moyenne calculée pour les relevés réalisés à l'extérieur des terrines est de 12°C et est significativement moins élevée (test de Wilcoxon-Mann-Whitney ; pvalue < 2,2e-16) que celle calculée avec les relevés réalisés à l'intérieur des terrines qui est de 12,8°C. Des moyennes de températures de 12,6°C et de 14°C ont été calculées respectivement pour les facteurs « halogène » et « LED » (Figure 20, « pirate plot » C) et sont significativement différentes (test de Wilcoxon-Mann-Whitney ; pvalue < 2,2e-16). Le « pirate plot » D et les diagrammes bâtons E et F illustrent l'impact du volume d'eau sur la température et les plantules. Entre les modalités « 600mL », « 700mL » et « 800mL », aucune différence significative n'existe (ANOVA suivie d'une procédure de Tukey) entre les taux de germination qui sont de 76,8%, 76,8% et 79,8% ni entre les aires foliaires totales qui sont de 311cm², 312cm² et 316cm², respectivement. Ce n'est pas le cas des températures moyennes. Une différence significative (modèle linéaire mixte suivi d'une procédure de Tukey) existe entre les températures moyennes des modalités « 600mL » et « 800mL » (12,9°C et 12,6°C respectivement) et entre celles des modalités « 700mL » et « 800mL » (qui sont de 12,8°C et 12,6°C). Il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les températures des modalités « 600mL » et « 700mL ». L'impact du type d'éclairage sur les plantules de mâche est présenté par les diagrammes bâtons G et H de la Figure 20. Le taux de germination moyen des plantules ayant poussé sous des néons halogène (78,3%) est significativement plus bas (test de Welch ; pvalue = 0,0443) que celui des plantules ayant poussé sous un éclairage LED (85,2%). Concernant l'aire foliaire totale moyenne des plantules pour le facteur « halogène » (314cm²), elle est significativement plus petite (test t de Student ; pvalue = 0,012) que celle calculée pour les plantules sous LED (370cm²).

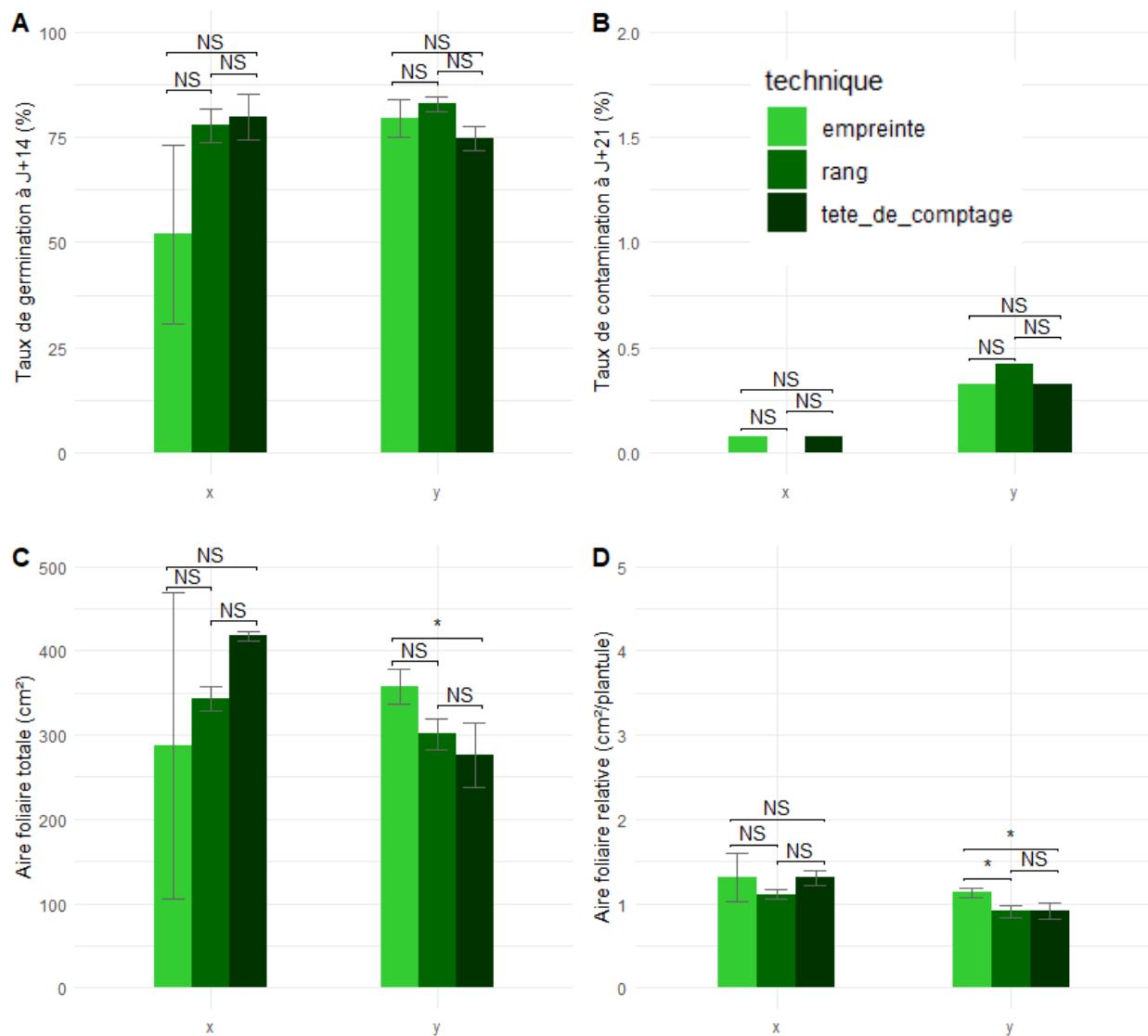


Figure 21 : Ensemble de diagrammes bâtons illustrant les résultats de l'étude de l'impact de la densité de semis. « X » et « Y » correspondent aux lettres des lots utilisés. $pvalue > 0,05 \rightarrow \text{NS}$; $pvalue > 0,01 \rightarrow *$; $pvalue > 0,001 \rightarrow **$; $pvalue < 0,001 \rightarrow ***$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. A : Taux moyen de germination à J+14 des différents lots de semences en fonction de la technique de semis employée ; B : Taux de contamination à J+21 ; C : Aire foliaire totale à J+21 ; D : Aire foliaire relative à J+21.

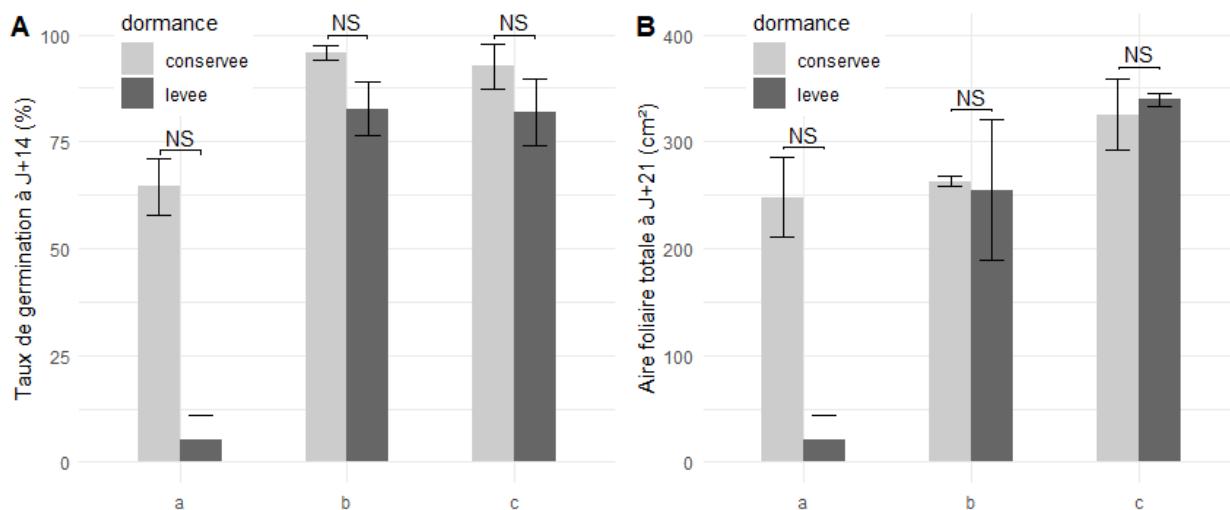


Figure 22 : Ensemble des diagrammes bâtons illustrant les résultats de l'étude de l'impact de la dormance. « a », « b » et « c » correspondent aux numéros des lots utilisés. $pvalue > 0,05 \rightarrow \text{NS}$; $pvalue > 0,01 \rightarrow *$; $pvalue > 0,001 \rightarrow **$; $pvalue < 0,001 \rightarrow ***$. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. A : taux de germination à J+14 des différents lots en fonction du traitement de la dormance ; B : aire foliaire totale à J+21.

3.2.2. Densité de semis

Concernant les taux de germination moyens (Figure 21 diagramme A) des graines semées à l'aide d'une empreinte, avec la technique des rangs ou avec une tête de comptage, il n'y a aucune différence significative (ANOVA suivie d'une procédure de Tukey) pour le lot X entre ces trois techniques (51,90%, 77,75%, 79,75% respectivement) ni pour le lot Y (79,41%, 82,91%, 74,75%). Le pourcentage de 51,90% calculé chez le lot X est dû à la présence de champignons saprophytes dans une des terrines ayant entraîné un manque à la levée, ce qui explique également l'écart-type important. Les taux de contamination moyens (Figure 21 diagramme B) pour le lot X qui sont de 0,083%, 0% et 0,083% respectivement pour les semis avec empreinte, en rang et avec tête de comptage, ne sont pas significativement différents (test de Kruskal-Wallis suivi d'une procédure de Tukey). Il en est de même pour le lot Y avec des taux de contamination de 0,33%, 0,42% et 0,33% (ANOVA suivie d'une procédure de Tukey). Les aires totales et relatives (Figure 21 diagrammes C et D) du lot X ne sont pas non plus significativement différentes (test de Kruskal-Wallis pour l'aire totale et une ANOVA pour l'aire relative). Elles sont égales à 287,39cm², 343,50cm² et 417,29cm² pour les aires totales et égales à 1,31cm²/plantule, 1,11cm²/plantule et 1,31cm²/plantule pour les aires relatives. Ces valeurs pour le lot X ont été obtenues avec les semis avec une empreinte, en rang ou à la tête de comptage, respectivement. Concernant le lot Y, pour l'aire totale, il n'y a pas de différence significative (ANOVA) entre les résultats obtenus avec les semis avec une empreinte et ceux obtenus avec les semis en rang (357,43cm² et 300,90cm²) ni entre les aires totales pour les semis en rang et ceux réalisés avec une tête de comptage (300,90cm² et 275,98cm²). Entre les résultats des semis avec empreinte et ceux des semis avec tête de comptage, il existe une différence significative. Les aires relatives du lot Y sont significativement différentes (ANOVA) entre les facteurs « empreinte » et « rang » (1,12cm²/plantule et 0,90cm²/plantule) et entre les facteurs « empreinte » et « tete_de_comptage » (1,12cm²/plantule et 0,92cm²/plantule). Ce n'est pas le cas entre les facteurs « rang » et « tete_de_comptage ».

3.2.3. Dormance

Les taux de germination moyens et les aires foliaires totales de cette étude sont synthétisés dans la Figure 22 ci-contre. Les taux de germination moyens pour les échantillons dont la dormance a été conservée et ceux des échantillons dont la dormance a été levée sont, respectivement, de 64,41% et 5,33% pour le lot a, de 95,75% et 82,66% pour le lot b et de 92,66% et 81,91% pour le lot c. Les aires foliaires totales sont, respectivement pour les échantillons à la dormance conservée et ceux à la dormance levée, de 247,75cm² et 21,22cm² pour le lot a, de 262,41cm² et 254,74cm² pour

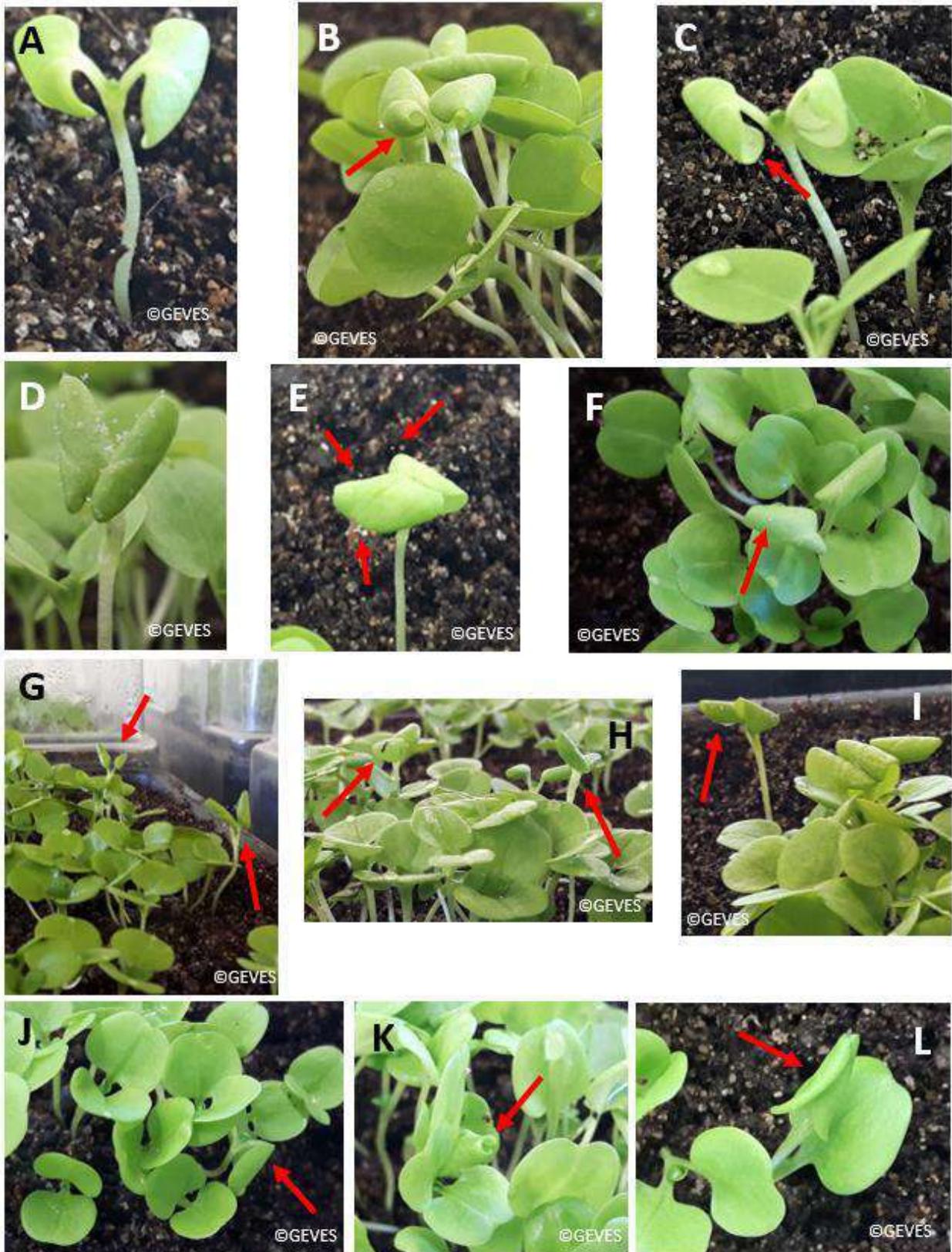


Figure 23 : clichés semis de plantules de mâche réalisés 21 jour après le semis dans le cadre de la détermination de la spécificité analytique de la méthode de détection. A, B et C : enroulements des cotylédons sans sporangiophores typiques de *Peronospora valerianellae* ; D, E et F : enroulements des cotylédons avec sporangiophores typiques de *Peronospora valerianellae* ; G, H et I : exemples typiques de plantules infectées par le mildiou présentant un étiollement ; J, K et L : enroulements de cotylédons non typiques.

le lot b et de 325,37cm² et 339,38cm² pour le lot c. Il n'y a aucune différence significative entre les taux de germination et les aires foliaires totales des lots (test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

3.3. Spécificité analytique

Les clichés regroupés dans la Figure 23 ont tous été réalisés avec des plantules de mâche âgées de 21 jours après des semis effectués lors des différents essais de standardisation et de validation de la méthode de détection dite par « grow-out ». Sur les clichés A, B et C sont présentées des plantules présentant un enroulement en direction de la tige dans le sens de la nervure mais ne présentant pas de sporangiophores. Concernant D, E et F, il s'agit de plantules présentant à la fois un enroulement décrit plus haut, mais également des sporangiophores blancs avec une dichotomie. G, H et I sont des clichés servant à illustrer une particularité des plantules de mâche présentant des symptômes typiques du mildiou. Cette particularité est leur taille. Dans le cas de J, K et L, il s'agit de photos représentant des enroulements de cotylédons de plantules de mâche qui ne sont pas dus à la présence de *Peronospora valerianellae*.

3.4. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle

L'analyse au microscope optique des solutions obtenues après le lavage des feuilles et du terreau issus des terrines inoculées avec les deux isolats de *Peronospora valerianellae* n'ont données aucun résultat. Autrement dit, aucune oospore n'a pu être observée.

4. Discussion

4.1. Standardisation de la méthode

4.1.1. Température et volume d'eau

Pour rappel, le but de ces essais était de déterminer l'impact du volume d'eau sur la température au sein des terrines et sur les plantules, de déterminer les paramètres susceptibles de faire varier la température ainsi que de déterminer si des différences significatives existent entre des éclairages avec des néons halogène ou des LED.

D'après les résultats présentés dans les diagrammes E et F de la Figure 20, le volume d'eau ne semble pas avoir d'effet sur les plantules, que ce soit sur le taux de germination ou l'aire foliaire. Le volume d'eau semble, cependant, avoir un impact sur la température enregistrée au sein des terrines. Ces résultats peuvent être mis en parallèle de ceux décrits dans les « pirate plots » A et B de la Figure 20. En effet, la température est plus élevée lorsque les lumières du module climatique sont allumées que lorsqu'elles sont éteintes. Ceci suggère que l'éclairage émet de la chaleur. Cette chaleur semble se maintenir à l'intérieur des terrines car la température y est plus élevée qu'à l'extérieur. Cela peut s'expliquer par le fait que le contenu de chaque terrine est isolé du reste du module climatique par un capot transparent. C'est pour la modalité avec le volume d'eau le plus important que la température est la plus basse. Le volume le plus optimal pour cette méthode semble être, d'après cette étude, de 800mL car des températures basses favorisent le développement de *Peronospora valerianellae* (Herforth *et al.*, 2017).

En ce qui concerne les résultats obtenus sous néons halogène et ceux obtenus sous LED, une différence au niveau des températures et des plantules est observable. Pour les différences de températures, la température moyenne est la plus élevée pour l'essai sous LED. Ce résultat est plutôt surprenant car des études comme celle réalisées par Pinho *et al.* (2012) et Morrow (2008) décrivent les LED comme un système d'éclairage émettant peu de chaleur, comparé aux autres systèmes. L'explication de ces résultats pourrait se trouver dans la fiche produit des éclairages LED utilisés pour cet essai. Aucune mention de température n'est faite mais le produit est décrit comme destiné à l'éclairage des poulaillers pour augmenter la fréquence de ponte et la qualité des œufs. Ce n'est donc un éclairage conçu pour l'horticulture. En ce qui concerne l'effet des éclairages LED sur la germination et la surface foliaire, l'hypothèse qui peut être émise est que c'est la température moyenne plus élevée sous LED qui est à l'origine d'un taux de germination plus important.

Au sein du laboratoire de pathologie du GEVES, dans l'équipe chargée des études des résistances variétales, les essais de routines sur semences de mâche se déroulent, pour les phases de production de plantules, dans des modules climatiques à 20°C pour garantir une bonne levée ainsi qu'un bon développement des plantules. Donc les températures relevées sous LED favorisent la germination et le développement des plantules. Faute de disponibilité de lots positifs, cet essai sous LED a été conduit avec des semences saines. L'effet sur *Peronospora valerianellae* est donc inconnu. Il serait judicieux de reproduire cet essai avec des lots contaminés par *Peronospora valerianellae*, pour voir s'il a un impact sur le couple hôte/agent pathogène.

4.1.2. Densité de semis

Le but de cet essai était de comparer des densités de semis, ou plutôt des techniques de semis générant des densités différentes. Pour le lot X, il n'y a aucune différence significative entre les techniques, quel que soit le paramètre étudié. Pour le lot Y, seule la surface foliaire est impactée. Des difficultés de lectures lors de l'observation des symptômes avaient été rencontrées avec la technique de semis en rang utilisée en routine, en raison de la densité de semis entraînant un chevauchement des plantules au sein des rangs. Ce chevauchement peut être à l'origine de contamination croisée. La technique de semis à l'aide d'une empreinte de 400 trous est la technique pour laquelle la répartition des semences sur la terrine était la plus homogène. Cependant, le coût élevé de fabrication d'une seule empreinte, couplé au temps d'expérimentation important (chaque trou creusé doit être rempli individuellement par une seule semence) sont des facteurs suffisants contraignants pour ne pas retenir cette technique de semis. Un semis à l'aide d'une tête de comptage (comparable à une répartition aléatoire sur l'ensemble de la terrine obtenue avec un semis à la volée) pourrait être envisagé pour remplacer le semis en rangs, les résultats entre les deux méthodes étant équivalents. Cette technique a aussi l'avantage de limiter le chevauchement des plantules, et donc par la même occasion une potentielle contamination croisée.

4.1.3. Dormance

Cet essai avait été réalisé dans le but de déterminer si la dormance avait un impact sur la méthode de détection. Aucune différence significative n'a été établie entre les différents traitements de la dormance, tous lots confondus. Le fait que les échantillons pour lesquels la dormance a été conservée présentent les mêmes résultats que ceux des échantillons pour lesquels la dormance a été levée est surprenant. Les résultats obtenus pour les échantillons issus du lot a, dont la dormance a été levée sont également inattendus. Une hypothèse qui pourrait expliquer le premier fait

surprenant est que les lots ont été stockés dans une pièce prévue à cet effet, réfrigérée à 5°C. Or, il semblerait qu'un stockage de plusieurs jours à 5°C serait un moyen de lever la dormance des graines de mâche (Regeneration of lamb's lettuce, wur.nl ; semencier 1, communication personnelle). L'explication pour le deuxième fait surprenant est la présence de champignons saprophytes qui se sont développés abondamment dans les terrines des échantillons provenant du lot a dont la dormance avait été levée avec une solution de gibberelline. L'hypothèse qui peut être émise ici est que les semences de ce lot contenaient des agents pathogènes saprophytes et que leur humidification par la solution de gibberelline, couplée au fait que les semences n'ont pas été séchée avant le semis mais seulement égouttées, a favorisé le développement de ces champignons opportunistes. Leur développement a été tel que les graines ont pourri avant d'avoir pu germer. Outre ces résultats un peu surprenant, l'essai n'étant pas concluant, l'impact de la dormance sur la capacité de la méthode à détecter l'agent pathogène reste à déterminer. En toute logique, la dormance provoquerait un manque à la levée, ce qui rendrait impossible la détection du mildiou. Une levée de dormance serait donc à envisager, soit par une mise au froid, soit par l'utilisation d'une solution de gibberelline suivie d'un séchage des semences pour éviter l'apparition d'organismes saprophytes.

4.2. Essais de validation

4.2.1. Limite de détection

La limite de détection d'une méthode, ou sensibilité analytique, est, selon l'ISTA, la plus petite quantité de l'agent pathogène cible présent dans un échantillon qu'il est possible de détecter avec cette méthode. Une limite de détection de 0,69% a été établie grâce aux essais réalisés lors de ce stage. La limite de détection souhaitée idéalement par le groupe de travail de l'ISHI-Veg est de 0,25% (1 semence contaminée parmi 399 semences saines). Cependant le seuil obtenu ici est un seuil qui semble réaliste (entre 2 et 3 plantules dans un échantillon de 400) au vu de la disponibilité des lots faiblement contaminé. Un nouvel essai pourrait être envisagé selon le plan de validation rédigé par le groupe de travail de l'ISHI-Veg, à savoir une dilution d'un lot fortement contaminé à l'aide de semences saines afin d'obtenir des échantillons avec un taux de contamination théorique de 0,25%.

4.2.2. Spécificité analytique

Pour rappel, la spécificité analytique est, selon l'ISTA, la capacité d'un test à détecter l'agent pathogène cible tout en le différenciant des non-cibles. Les clichés de la Figure 23 ont pour but de décrire les symptômes typiques en les comparant à ce qui n'est pas typique.

Dans le cas de A, B et C, cet enroulement est un symptôme typiquement causé par *Peronospora valerianellae*. Lors des lectures, les plantules présentant ce type de symptôme doivent alors être comptées comme contaminées par le mildiou de la mâche, même en l'absence de sporangiophores. Pour D, E et F, en plus de l'enroulement typique il y a aussi des sporangiophores eux aussi typiques de *Peronospora valerianellae*. Ce type de plantule doit aussi être comptabilisé dans le total des plantules infectées lors des phases de lectures de cette méthode de détection.

Les clichés G, H et I ont été présentés pour la description des symptômes typiques car il a été observé à plusieurs reprises et de façon systématique une élongation plus importante des tiges des plantules infectées par le mildiou par rapport à celles des plantules saines. Cette différence de hauteur pourrait faciliter les lectures de symptômes et pourrait permettre, dans le cas où il y a enroulement sans sporangiophores, d'affiner le comptage des plantules infectées.

Les enroulements non typiques des clichés J, K et L ont généralement lieu lorsque la densité de plantules est importante ou bien lorsque la semence est restée accrochée à la plantule après émergence, et souvent perpendiculairement à la nervure. Ces caractéristiques pourraient servir d'aide à la comptabilisation des plantules infectées par le mildiou car, étant facilement différenciables des enroulements typiques.

4.3. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle

A l'issu de ce stage, aucune méthode de contamination artificielle de semences de mâche par *Peronospora valerianellae* n'a pu être mise au point car la tentative de production d'oospores en laboratoire n'a pas porté ses fruits. Cette absence de résultat pourrait s'expliquer par le fait que la race physiologique des isolats de *Peronospora valerianellae* ne soit pas connue. En effet, la reproduction sexuée des champignons biotrophes nécessite une compatibilité « sexuelle » entre les cellules impliquées pour avoir lieu. De plus, aucune mention de compatibilité sexuelle entre les races citées dans l'introduction n'a été trouvée. A cela peut s'ajouter le fait que les plantules de mâche n'ont pas été stressées après inoculation comme c'est le cas dans l'étude de Frinking *et al.* (1985), alors qu'il semblerait que la probabilité pour qu'il y ait une production d'oospores soit plus importante avec des plantules stressées. Pour conclure sur cette tentative non concluante, il peut être noté que le protocole de lavage de sol mis au point spécialement pour cet essai pourrait servir au laboratoire de pathologie du GEVES pour d'autres études.

Tableau VII : Résumé des conclusions des essais de standardisation décrits dans le rapport. Vert : données suffisantes pour conclure ; Orange : besoin de réaliser d'autres essais pour conclure ; Rouge : essais à refaire.

Facteurs pouvant impacter la méthode	Modalités retenues après les essais
Volume d'eau	800mL
Température	12°C
Eclairage	
Technique de semis	Tête de comptage
Impact de la dormance	

5. Conclusions et perspectives

Le laboratoire de pathologie du GEVES est le « project lead » du projet d'officialisation de la méthode de détection par « grow-out » du mildiou *Peronospora valerianellae* sur semences de mâche. Cela s'inscrit dans une démarche d'homogénéisation et de validation des méthodes d'analyses sanitaires des semences initiée par le groupe de travail d'ISHI-Veg. Une première phase de ce stage a consisté en l'identification et en la standardisation des paramètres qui pouvaient être modifiés. Les paramètres qui ont été testés sont le volume d'eau, le type d'éclairage, la densité de semis. L'impact de la dormance a aussi été testé. Pour le volume d'eau, il semblerait qu'un volume de 800mL par terrine garantisse une bonne humidité et des températures relativement basses. Pour le type d'éclairage, le laboratoire de pathologie du GEVES projette d'installer néons LED dans les modules climatiques. Les résultats obtenus sous LED ne sont pas concluants, car les LED qui ont été installées pour ces essais sont conçues pour l'élevage avicole et ne sont donc pas adaptées spécifiquement aux études de biologie végétale. Pour la densité de semis, des facteurs autres que biologiques comme le temps de manipulation et le coût des outils sont à prendre en compte dans le choix de la technique de semis la plus adéquate. Aux vues des éléments abordés dans les parties précédentes et du matériel à disposition au sein du laboratoire, il semblerait que l'utilisation d'une tête de comptage pour semer soit une bonne alternative à la technique des rangs. Concernant la dormance, l'essai réalisé durant ce stage n'étant pas concluant, d'autres essais devront être réalisés pour véritablement évaluer l'impact de la dormance sur la méthode de détection. Il paraît évident qu'un lot dormant ne soit pas propice à une analyse de détection de *Peronospora valerianellae* via une méthode dite par « grow out ». Une levée de dormance semblerait évidente pour palier à un manque à la levée. Le résumé de ces conclusions se trouve dans le Tableau VII. Des essais de validation préliminaires ont été faits pour la sensibilité analytique et la spécificité analytique (définition des symptômes caractéristiques *via* l'observation des enroulements et des sporulations typiques). Une limite de détection de 0,69% a été déterminée. Cependant, un nouvel essai pourrait être envisagé pour correspondre aux critères idéals (0,25%) définis par le groupe de travail d'ISHI-Veg. Ces essais préliminaires de validation sont une introduction aux essais à venir, notamment celui de reproductibilité impliquant un essai inter-laboratoire. Le laboratoire de pathologie du GEVES étant le « project lead » de ce projet de validation, il est en charge de réaliser l'évaluation des autres critères de performance (la spécificité et la sensibilité diagnostique, la répétabilité et la reproductibilité) et de l'organisation des essais inter-laboratoires (test d'homogénéité et de stabilité des lots).

6. Références

6.1. Bibliographie

- Aveling, T. A.** (2014). Global standards in seed health testing. In *Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material* (pp. 17-28). Springer, Dordrecht.
- Bazzocchi G, Maini S.** 2017. Sustainable Pest Management. In: Orsini F., In: Dubbeling M., In: de Zeeuw H., In: Gianquinto G, eds. *Rooftop Urban Agriculture*. Cham: Springer International Publishing, 167–193.
- Bonneuil C, Thomas F.** 2012. *Semences, une histoire politique : amélioration des plantes, agriculture et alimentation en France depuis la Seconde Guerre mondiale*. ECLM.
- Braun U, Bensch K.** 2019. Annotated list of taxonomic novelties published in “Fungi Rhenani Exsiccati” Fasc. 1 to 7, issued by K. W. G. L. Fuckel in 1863. , 29.
- Broman, K. W., & Woo, K. H.** (2018). Data organization in spreadsheets. *The American Statistician*, 72(1), 2-10.
- Frinking, H. D., Harrewijn, J. L., & Geerds, C. F.** (1985). Factors governing oospore production by *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in cotyledons of spinach. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 91(5), 215-223.
- Gallais A.** 2018. *Histoire de la génétique et de l'amélioration des plantes*. Editions Quae.
- Göker, M., García-Blázquez, G., Voglmayr, H., Telleria, M. T., & Martín, M. P.** (2009). Molecular taxonomy of phytopathogenic fungi: a case study in *Peronospora*. *PloS one*, 4(7).
- Grimault V.** 2015. Pests and seed health testing. General introduction on detection of bacteria, viruses, fungi and nematodes in seeds. , 30.
- Gullino ML, Gilardi G, Garibaldi A.** 2019. Ready-to-Eat Salad Crops: A Plant Pathogen’s Heaven. *Plant Disease* **103**, 2153–2170.
- Herforth-Rahmé J, Fuchs JG, Hofer V, Schnueriger M, Schärer HJ, Koller M.** 2017. Bioseedling: a chain approach to the production of healthier seeds and seedlings of Lamb’s lettuce *Valerianella locusta*. *Acta Horticulturae*, 39–46.
- Hidalgo, O., Garnatje, T., Susanna, A., & Mathez, J.** (2004). Phylogeny of Valerianaceae based on matK and ITS markers, with reference to matK individual polymorphism. *Annals of Botany*, 93(3), 283-293.
- Hilhorst, H. W. M., & Karssen, C. M. (1992).** Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant growth regulation*, 11(3), 225-238.
- Kandel SL, Mou B, Shishkoff N, Shi A, Subbarao KV, Klosterman SJ.** 2019. Spinach Downy Mildew: Advances in Our Understanding of the Disease Cycle and Prospects for Disease Management. *Plant Disease* **103**, 791–803.
- Koike ST.** 2008. Downy Mildew Caused by *Peronospora valerianellae* on Corn-Salad (*Valerianella locusta*) in California. *Plant Disease* **92**, 1470–1470.
- Lang-Yona N, Pickersgill DA, Maurus I, Teschner D, Wehking J, Thines E, Pöschl U, Després VR, Fröhlich-Nowoisky J.** 2018. Species Richness, rRNA Gene Abundance, and

Seasonal Dynamics of Airborne Plant-Pathogenic Oomycetes. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2673.

Montes-Borrego M, Landa BB, Navas-Cortés JA, Muñoz-Ledesma FJ, Jiménez-Díaz RM. 2009. Role of oospores as primary inoculum for epidemics of downy mildew caused by *Peronospora arborescens* in opium poppy crops in Spain: *Opium poppy downy mildew inoculum*. *Plant Pathology* **58**, 1092–1103.

Morrow, R. C. (2008). LED lighting in horticulture. *HortScience*, 43(7), 1947-1950.

Muminovic J, Melchinger AE, Lubberstedt T. 2004. Genetic diversity in cornsalad (*Valerianella locusta*) and related species as determined by AFLP markers. *Plant Breeding* **123**, 460–466.

Nicola S, Fontana E. 2014. Fresh-Cut Produce Quality. *Postharvest Handling*. Elsevier, 217–273.

Nicola S, Pignata G, Casale M, Lo Turco PE, Gaino W. 2016. Overview of a Lab-scale Pilot Plant for Studying Baby Leaf Vegetables Grown in Soilless Culture. *The Horticulture Journal* **85**, 97–104.

Parente CP, Lima MJR, Teixeira-Lemos E, Moreira MM, Barros AA, Guido LF. 2013. Phenolic Content and Antioxidant Activity Determination in Broccoli and Lamb's Lettuce. *7*, 4.

Pavón, C. F., Babadoost, M., & Lambert, K. N. (2008). Quantification of Phytophthora capsici oospores in soil by sieving-centrifugation and real-time polymerase chain reaction. *Plant disease*, 92(1), 143-149.

Pietrek G, Zinkernagel V. *peronospora valerianellae*, the downy mildew of lamb's lettuce (*valerianella locusta*). , 2.

Pinho, P., Jokinen, K., & Halonen, L. (2012). Horticultural lighting—present and future challenges. *Lighting Research & Technology*, 44(4), 427-437.

Ramos-Bueno RP, Rincón-Cervera MA, González-Fernández MJ, Guil-Guerrero JL. 2016. Phytochemical Composition and Antitumor Activities of New Salad Greens: Rucola (*Diplotaxis tenuifolia*) and Corn Salad (*Valerianella locusta*). *Plant Foods for Human Nutrition* **71**, 197–203.

Schärer HJ, Schnueriger M, Hofer V, Herforth-Rahmé J, Koller M. 2017. Effect of different seed treatments against seed borne diseases on corn salad. *Acta Horticulturae*, 33–38.

Schena L, Nicosia MGLD, Sanzani SM, Faedda R, Ippolito A, Cacciola SO. 2013. development of quantitative pcr detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Plant Pathology* **95**, 7–24.

Spring, O., Gomez-Zeledon, J., Hadziabdic, D., Trigiano, R. N., Thines, M., & Lebeda, A. (2018). Biological characteristics and assessment of virulence diversity in pathosystems of economically important biotrophic oomycetes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(6), 439-495.

Strothmann W, Ruckelshausen A, Hertzberg J, Scholz C, Langsenkamp F. 2017. Plant classification with In-Field-Labeling for crop/weed discrimination using spectral features and 3D surface features from a multi-wavelength laser line profile system. *Computers and Electronics in Agriculture* **134**, 79–93.

Thines M, Choi Y-J. 2016. Evolution, Diversity, and Taxonomy of the Peronosporaceae, with Focus on the Genus *Peronospora*. *Phytopathology* **106**, 6–18.

Verdin, E., Marais, A., Wipf-Scheibel, C., Faure, C., Pelletier, B., David, P., ... & Candresse, T. (2018). Biological and Genetic Characterization of New and Known Necroviruses Causing an Emerging Systemic Necrosis Disease of Corn Salad (*Valerianella locusta*) in France. *Phytopathology*, 108(8), 1002-1010.

Žnidarčič D, Kacjan-Maršič N. 2008. Corn salad (*Valerianella olitoria* L.) yield response to cell size of plug trays. *Acta agriculturae Slovenica* **91**.

6.2. Sitographie

<https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/Chd1916/detail/> (consulté le 04/03/20)

<https://ahdb.org.uk/knowledge-library/vegetable-seed-quality-storage-and-handling-2> (consulté le 15/07/20)

<https://fr.calameo.com/read/0038118919cbe2c91734c> (consulté le 04/03/20)

<http://draaf.pays-de-la->

loire.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Diaporama_Maraichage13112013_cle8e375e.pdf (consulté le 05/03/20)

<https://www.fnams.fr/wp-content/uploads/2019/06/2019-05-RA.pdf> (consulté le 25/05/20)

<https://www.inao.gouv.fr/produit/14036> (consulté le 04/03/20)

<https://www.geves.fr/qui-sommes-nous/> (consulté le 03/03/20)

https://occitanie.chambre-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/Occitanie/076_Inst-Occitanie/Documents/Productions_techniques/Agriculture_biologique/Espace_ressource_bio/Maraichage_bio/CoutsProd-BouchesduRhone-TrophySA-2014.pdf (consulté le 02/04/20)

https://occitanie.chambre-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/Occitanie/076_Inst-Occitanie/Documents/Productions_techniques/Agriculture_biologique/Espace_ressource_bio/Maraichage_bio/ITK-Bretagne-Mache.pdf (consulté le 05/03/20)

<https://www.ouest-france.fr/pays-de-la-loire/brain-sur-lauthion-49800/maine-et-loire-61-personnes-intoxiques-ce-que-l-sait-6009701> (consulté le 02/06/20)

<https://www.seedtest.org/en/home.html> (consulté le 15/04/20)

<https://www.seedtest.org/upload/cms/user/TCOM-P-10-ValidatingmethodsandresultsofCTsV1.141.pdf> (consulté le 26/05/20)

<https://www.worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg-protocols/> (consulté le 20/04/20)

<https://www.wur.nl/en/show/Regeneration-of-lambs-lettuce.htm> (consulté le 04/08/20)

Annexe I

Résultats des analyses statistiques réalisées sous R des données présentées dans la Figure 20

Diagramme A

```
wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: temp$temperature by temp$jour_nuit
W = 1358518, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Diagramme B

```
wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: tempendroit$temperature by tempendroit$mod
W = 136342, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Diagramme C

```
wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: lumtemp$temperature by lumtemp$lumiere
W = 1834982, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Diagramme D

```
mod 1smean      SE  df lower.CL upper.CL
1    12.9 0.0531 260     12.7     13.0
2    12.8 0.0531 260     12.7     12.9
3    12.6 0.0531 260     12.5     12.7

Degrees-of-freedom method: containment
Confidence level used: 0.95
Conf-level adjustment: sidak method for 3 estimates

$contrasts
contrast estimate      SE  df t.ratio p.value
1 - 2      0.0334 0.0292 2086 1.144   0.4872
1 - 3      0.2480 0.0292 2086 8.490   <.0001
2 - 3      0.2146 0.0292 2086 7.346   <.0001
```

Diagramme E

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: lm(formula = txgerm ~ mod, data = voleau)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
700mL - 600mL == 0	0.08333	5.41004	0.015	1.000
800mL - 600mL == 0	3.00000	5.41004	0.555	0.848
800mL - 700mL == 0	2.91667	5.41004	0.539	0.855

(Adjusted p values reported -- single-step method)

Diagramme F

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: lm(formula = surfacefol ~ mod, data = voleau)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
700mL - 600mL == 0	1.287	22.421	0.057	0.998
800mL - 600mL == 0	4.694	22.421	0.209	0.976
800mL - 700mL == 0	3.406	22.421	0.152	0.987

(Adjusted p values reported -- single-step method)

Diagramme G

welch Two sample t-test

```
data: txairelum$txgerm by txairelum$lum
t = -2.618, df = 5.3242, p-value = 0.04443
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -13.66742 -0.24925
sample estimates:
mean in group halogene      mean in group LED
 78.29167                  85.25000
```

Diagramme H

Two Sample t-test

```
data: txairelum$surfacefol by txairelum$lum
t = -4.2133, df = 12, p-value = 0.001203
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -84.74988 -26.97429
sample estimates:
mean in group halogene      mean in group LED
 313.9472                  369.8093
```

Résultats des analyses statistiques réalisées sous R des données présentées dans la Figure 21

Diagramme A

```
> summary(lm4tukey)

  simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = txgerm ~ technique, data = lot_x)

Linear Hypotheses:
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
rang - empreinte == 0           25.83     10.52   2.455  0.1079
tete_de_comptage - empreinte == 0 27.83     10.52   2.645  0.0849 .
tete_de_comptage - rang == 0      2.00     10.52   0.190  0.9804
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> summary(lm5tukey)

  simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = txgerm ~ technique, data = lot_y)

Linear Hypotheses:
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
rang - empreinte == 0           3.500     2.668   1.312  0.4397
tete_de_comptage - empreinte == 0 -4.667     2.668  -1.749  0.2638 .
tete_de_comptage - rang == 0      -8.167    2.668  -3.061  0.0503 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Diagramme B

```
> kruskal.test(txconta~technique, data=lot_x)

  Kruskal-wallis rank sum test

data: txconta by technique
Kruskal-wallis chi-squared = 1.1429, df = 2, p-value = 0.5647

> summary(lm7tukey)

  Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = txconta ~ technique, data = lot_y)

Linear Hypotheses:
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
rang - empreinte == 0 8.333e-02 3.118e-01 0.267 0.962
tete_de_comptage - empreinte == 0 -6.799e-17 3.118e-01 0.000 1.000
tete_de_comptage - rang == 0 -8.333e-02 3.118e-01 -0.267 0.962
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Diagramme C

```
> kruskal.test(airefol~technique, data=lot_x)

  Kruskal-wallis rank sum test

data: airefol by technique
Kruskal-wallis chi-squared = 2.4, df = 2, p-value = 0.3012

> summary(lm9tukey)

  Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: lm(formula = airefol ~ technique, data = lot_y)

Linear Hypotheses:
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
rang - empreinte == 0 -56.53 22.44 -2.520 0.0996 .
tete_de_comptage - empreinte == 0 -81.46 22.44 -3.631 0.0254 *
tete_de_comptage - rang == 0 -24.93 22.44 -1.111 0.5423
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Diagramme D

```
> summary(lm10tukey)

  Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

  Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

  Fit: lm(formula = airefolrelative ~ technique, data = lot_x)

  Linear Hypotheses:
                           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|) 
rang - empreinte == 0      -0.203333  0.144042 -1.412   0.393 
tete_de_comptage - empreinte == 0  0.003333  0.144042  0.023   1.000 
tete_de_comptage - rang == 0     0.206667  0.144042  1.435   0.383 
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> summary(lm11tukey)

  Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

  Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

  Fit: lm(formula = airefolrelative ~ technique, data = lot_y)

  Linear Hypotheses:
                           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|) 
rang - empreinte == 0      -0.22000  0.06406 -3.434   0.0320 *  
tete_de_comptage - empreinte == 0 -0.20667  0.06406 -3.226   0.0414 *  
tete_de_comptage - rang == 0     0.01333  0.06406  0.208   0.9765 
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Résultats des analyses statistiques réalisées sous R des données présentées dans la Figure 22

Diagramme A

```
> wilcox.test(lota$txgermj14~lota$dormance)
  wilcoxon rank sum exact test
  data: lota$txgermj14 by lota$dormance
  w = 9, p-value = 0.1
  alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

> wilcox.test(lotb$txgermj14~lotb$dormance)
  wilcoxon rank sum exact test
  data: lotb$txgermj14 by lotb$dormance
  w = 9, p-value = 0.1
  alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

> wilcox.test(lotc$txgermj14~lotc$dormance)
  wilcoxon rank sum exact test
  data: lotc$txgermj14 by lotc$dormance
  w = 7, p-value = 0.4
  alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Diagramme B

```
> wilcox.test(lota$aire~lota$dormance)
  wilcoxon rank sum exact test
  data: lota$aire by lota$dormance
  w = 9, p-value = 0.1
  alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

> wilcox.test(lotb$aire~lotb$dormance)
  wilcoxon rank sum exact test
  data: lotb$aire by lotb$dormance
  w = 6, p-value = 0.7
  alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

> wilcox.test(lotc$aire~lotc$dormance)
  wilcoxon rank sum exact test
  data: lotc$aire by lotc$dormance
  w = 3, p-value = 0.7
  alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

AUTORISATION DE DIFFUSION EN LIGNE

I ÉTUDIANT(E)

N° étudiant : 17008188 Email : lea.mandelli@outlook.fr

Je soussigné(e) Mme Léa MANDELLI être l'auteur du document intitulé
Amélioration d'une méthode citée par
[Redaction] et soutenu le 09 09 2020

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury, certifie que les documents non libres de droits figurant dans mon mémoire seront signalés par mes soins et pourront être retirés de la version qui sera diffusée en ligne par le Service Commun de la Documentation de l'Université d'Angers. Agissant en l'absence de toute contrainte, et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux, j'autorise, sans limitation de temps, l'Université d'Angers à les diffuser sur internet dans les conditions suivantes :

- diffusion immédiate du document en texte intégral
 diffusion différée du document en texte intégral ; date de mise en ligne : [Redaction]
 n'autorise pas sa diffusion dans le cadre du protocole de l'Université d'Angers

À Angers, le 28 08 2020

Signature :

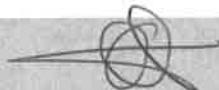


II MAÎTRE DE STAGE

- autorise la diffusion dans le cadre du protocole de l'Université d'Angers
 n'autorise pas la diffusion dans le cadre du protocole de l'Université d'Angers

Nom et signature du maître de stage :

ORGEUR Geoffrey



III JURY DE SOUTENANCE

- autorise la diffusion immédiate du document en texte intégral

OU

- autorise la diffusion différée du document en texte intégral ; à compter du : [Redaction]

en libre-accès OU en accès restreint

sous réserve de corrections

OU

- n'autorise pas sa diffusion dans le cadre du protocole de l'Université d'Angers

À Angers, le [Redaction]

Signature :



   	<p>Diplôme : Master Mention : Biologie Végétale (BV) Parcours : Gestion de la Santé des Plantes</p>
Auteur(s) : Léa Mandelli Date de naissance* : 14 septembre 1996 Nb pages : 30 Annexe(s) : 6 Année de soutenance : 2020	Organisme d'accueil : GEVES Adresse : 25 Rue Georges Morel, 49070 Beaucouzé, France Maître de stage : Geoffrey ORGEUR
Titre français : Amélioration d'une méthode de détection par « grow-out » de <i>Peronospora valerianellae</i> sur semences de <i>Valerianella locusta</i>	
Titre anglais: Improvement of a "grow-out" detection method of <i>Peronospora valerianellae</i> on seeds of <i>Valerianella locusta</i>	
<p>Résumé (1600 caractères maximum) : Le but de ce stage était d'identifier et de standardiser les paramètres d'une méthode de détection par « grow-out » du mildiou sur semences de mâche pour le compte du groupe de travail d'ISHI-Veg dans le but de réaliser des essais de validation pour rendre cette méthode officielle. Le volume d'eau, la température, la densité de semis et l'impact de la dormance sont les paramètres qui ont été étudiés lors des phases de standardisation. La sensibilité analytique et la spécificité analytique, qui sont une partie des critères de performance à valider pour qu'une méthode puisse être officialisée, ont pu être définies et testées lors de ce stage.</p>	
<p>Abstract (1600 caractères maximum): The goal of this internship was to identify and standardize the parameters of a grow-out method for the detection of downy mildew on corn salad seeds for the ISHI-Veg working group in order to carry out validation trials to make this method official. Water volume, temperature, sowing density and dormancy are the parameters that were studied during the standardization phases. Analytical sensitivity and analytical specificity, which are performance criteria to be validated for a method to be official, were defined and tested during this training.</p>	
<p>Mots-clés : mâche, semences, mildiou, analyse sanitaire, « grow-out » Key Words: corn salad, seeds, downy mildew, health testing, "grow-out"</p>	