

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**CONTRIBUTION METHODOLOGIQUE A LA MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DE LA
DIMOXYSTROBINE CONTRE LES *FUSARIUM* ET LES *MICRODOCHIUM* RESPONSABLES DES MALADIES
DE L'EPI**

P. ARMENGAUD ⁽¹⁾, I. SANTRAC ⁽²⁾

(1) PHILAGRO France - parc d'Affaire de Crécy - 2 rue Claude Chappe - 69771 SAINT DIDIER AU MONT D'OR- France - pascal.armengaud@philagro.fr

(2) Centre d'Evaluation Biologique - VILCERY - RD 104 - 45130 BACCON – France - ines.santrac@philagro.fr

RESUME

Les champignons du genre *Fusarium* et *Microdochium* responsables des attaques sur épis sont à l'origine de pertes de rendement et de contamination de la récolte en mycotoxines. Au-delà des techniques culturales, leur maîtrise repose aussi sur l'utilisation de fongicides. Parmi ces fongicides, SWING GOLD codé 507F, à base d'époxiconazole et de dimoxystrobine, fait preuve d'une efficacité au champ difficile à confirmer dans des tests de laboratoire. Les avancées méthodologiques développées dans cet article ont permis de confirmer *in vitro* l'activité de la dimoxystrobine contre *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. crockwellense*, *Microdochium majus*, *M. nivale*. Le mélange de dimoxystrobine et époxiconazole est lui-même très efficace et présente la particularité de limiter très fortement les valeurs extrêmes de CI_{50} que l'on peut retrouver dans certains cas. Cette tendance est confirmée dans le facteur où l'on ajoute du metconazole.

Mots-clés : dimoxystrobine, *Microdochium*, *Fusarium*, sensibilité, laboratoire.

ABSTRACT

Fusarium and *Microdochium* fungus attack the ear, damage the yield and contaminate the harvest with mycotoxins. Farmers use a large number of cropping methods but also fungicides in order to control fungus attacks. One the fungicide, SWING GOLD (code 507F), based on epoxiconazol and dimoxystrobin, show a good field efficacy, but it's difficult to confirm this efficacy in laboratory studies. Thanks to the methodology improvements describe in this publication, we have confirmed by *in vitro* studies the dimoxystrobin activity against *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. crockwellense*, *Microdochium majus*, *M. nivale*. The ready mixture dimoxystrobin and epoxiconazole is also very efficient and is also able to strongly reduce the extreme values sometimes encountered. The addition of metconazol confirms this trend.

Keywords: dimoxystrobine, *Microdochium*, *Fusarium*, susceptibility, laboratory.

La dimoxystrobine est une substance de la famille chimique des strobilurines ou Qols. Connues pour leur activité contre un grand nombre de maladies fongiques, des champignons comme le sclérotinia ou les fusarioses ne font pas partie de leur spectre d'activité habituel. Cependant, pour la lutte contre les maladies de l'épi, un fongicide fait montre d'une très grande efficacité pour limiter les infestations de *Microdochium sp.*, responsables de baisses de rendement. Cette activité de SWING GOLD, fongicide à base de dimoxystrobine et d'époxiconazole (codé 507F dans la suite de l'article), qui contient 50 g/l d'époxiconazole et 133 g/l de dimoxystrobine, est conforme à ce que l'on peut attendre d'un fongicide contenant des strobilurines. Cependant il limite également très fortement les teneurs en mycotoxines (DON) des céréales, performance originale pour ce type de fongicide. Cette activité observée au champ doit être expliquée par des travaux de laboratoire. L'objet de l'article qui suit est de décrire l'évolution des méthodes de laboratoire qui ont permis de la valider.

1 Etude préliminaire de l'activité *in vitro* du 507F (50 g/l d'époxiconazole + 133 g/l de dimoxystrobine) à l'encontre de *Fusarium spp.* et de *Microdochium majus*

Cette première étape a été effectuée par le Dr. Thierry Barchietto de la société BIOtransfer pour le compte de la société Philagro.

1.1 Objectif

Notre but est d'expliquer l'efficacité du 507F à l'encontre de *Fusarium spp.* et *Microdochium majus* par une étude de l'activité de chacun de ses composants comparativement à celle des principales substances actives utilisées.

1.2 Protocole expérimental

Les 6 spécialités commerciales utilisées dans cette étude sont:

- Réf.1 (SC à 125 g/l d'époxiconazole)
- PHF1014 (SC à 200 g/l de dimoxystrobine)
- 507F (SC à 50 g/l d'époxiconazole et 133 g/l de dimoxystrobine)
- Réf.2 (EW à 250 g/l de tébuconazole)
- Réf.3 (SC à 250 g/l d'azoxystrobine)
- Réf.4 (EC à 250 g/l de prothioconazole)

4 souches de champignons ont été choisies pour mener ces investigations préliminaires, *M. majus* (Mm1, sensible aux Qol et Mm2, résistante aux Qol), *F. graminearum* (Fg1) et *F. culmorum* (Fc2)

La première souche de *M. majus*, sensible aux fongicides de la famille des Qols, sert à valider l'efficacité des fongicides habituellement observée vis-à-vis de cette espèce avant la généralisation de cette résistance (entre les années 2007 à 2009). La seconde, résistante aux fongicides de la famille des Qols, nous donne le niveau actuel d'efficacité que l'on peut attendre des fongicides après la généralisation des résistances.

1.2.1 Etape 1

La technique retenue pour l'évaluation au laboratoire est la préparation d'un broyat mycélien pour *M. majus*. Pour *F. graminearum* et *F. culmorum*, ce sont des suspensions calibrées de macroconidies. Les boîtes de Pétri contenant du milieu SNA (Synthetischer-Nährstoffärmer-Agar) sont inoculées avec un implant mycélien de 5 mm de diamètre prélevé à partir du front de croissance d'une culture de *F. graminearum* ou de *F. culmorum*. Les boîtes de Pétri sont placées en incubation pendant 7 jours à 25°C et à l'obscurité, puis transférées sous lumière UV-A pendant 10 jours de manière à induire la sporulation des champignons. Après remise en suspension des macroconides, ces dernières sont calibrées à 2.10^4 spores/ml dans du milieu PDB (Potato dextrose broth) concentré 2 fois.

1.2.2 Etape 2.

Les doses de fongicides (0 – 0,00256 – 0,0128 – 0,064 – 0,32 – 1,6 – 8 et 40 µg a.i./ml) sont testées sur microplaques de titration.

1.2.3 Etape 3.

Evaluation de la croissance mycélienne et calcul des DE₅₀ (Dose Efficace de fongicide qui inhibe de 50 % la croissance mycélienne)

La croissance mycélienne est le calcul des DE₅₀ sont évalués après 3 jours d'incubation à 23°C et à l'obscurité, la croissance mycélienne est évaluée par mesure de la densité optique (DO) à 405 nm de chaque puits de la microplaque à l'aide d'un photomètre (Biotek, UVL-800X). Les valeurs de DO vont servir au calcul des pourcentages d'inhibition pour chaque dose de fongicide testée par rapport au témoin. Les valeurs de % d'inhibition vont permettre la détermination des DE₅₀ pour chaque produit et chaque souche de champignon testé à l'aide du logiciel XL-Stat (Addinsoft).

1.2.4 Etape 4

Evaluation du type d'interaction existant entre 2 molécules utilisées en mélange

Nous avons choisi d'utiliser la méthode préconisée Wadley plutôt que la méthode de Colby (Colby, 1967).. En effet, la méthode de Colby est dépendant de la dose des 2 produits testés en mélange, ce qui a tendance à provoquer une surestimation des valeurs obtenues. Afin de pallier ce problème, Wadley a mis en place un système reposant sur les valeurs de DE₅₀ et non plus les doses de produits (Wadley, 1967) .

La formule de Wadley permet de calculer la DE₅₀ théorique (DE_{50th}) d'un mélange de 2 produits :

$$DE_{50th} = (a + b) / (a/DE_{50(A)} + b/DE_{50(B)})$$

où A et B représentent les deux produits et a et b la proportion de ces 2 produits dans le mélange.

Dans le cas du 507F qui contient 50 g/l d'époxiconazole et 133 g/l de dimoxystrobine, le ratio entre ces 2 molécules est de 1 pour 2,66.

Le niveau d'interaction (R) est alors calculé de la manière suivante :

$$R = DE_{50th} / DE_{50obs}$$

où DE_{50obs} correspond à la valeur de la DE₅₀ obtenue expérimentalement pour le mélange des 2 produits A et B utilisés dans les proportions a et b.

Par définition, un effet additif existe si R = 1, un effet synergique existe si R > 1 et un effet antagoniste existe si R < 1. En raison de l'existence d'une certaine variabilité biologique des systèmes utilisés, la synergie est considérée comme significative si R ≥ 1,5 et l'antagonisme si R ≤ 0,5. L'interaction sera considérée comme additive lorsque 0,5 < R < 1,5 (Gisi, Binder, & Rimbach, 1985) .

1.3 Résultats

1.3.1 Evaluation de l'efficacité *in vitro* des différents fongicides à l'encontre de *M. majus*, *F. graminearum* et *F. culmorum*

Tableau 1 : Comparaison de la sensibilité (DE₅₀ µg m.a./ml) des souches de *M. majus* et des souches de *F. graminearum* et de *F. culmorum* aux 6 fongicides testés dans cette étude

Table 1 : Comparison of the susceptibility (DE₅₀ µg m.a./ml) of *M. majus*, *F. graminearum* and *F. culmorum* at the 6 listed fungicides tested in that study

Produit	Souche Mm1	Souche Mm2	Souche Fc2	Souche Fg1
Réf.1	0.55	0.27	0.23	0.55
PHF1014	0.015	> 40 (> 2666) ^a	> 40	> 40
507F	0.035	0.67	0.35	0.96
Réf.2	3.28	8.19	5.02	0.33
Réf.3	0.063	> 40 (> 625)	3.95	> 40
Réf.4	0.22	0.15	0.16	1.67

^aLes valeurs entre parenthèses correspondent aux facteurs de résistance (FR): ratio entre la DE₅₀ de la souche analysée et la DE₅₀ de la souche sensible.

1.3.2 Discussion

1.3.2.1 Evaluation de l'efficacité *in vitro* des différents fongicides à l'encontre de *M. majus*

1.3.2.1.1 Fongicides de la famille des Qols

Nos résultats (Tableau 1) montrent que la souche Mm1 de *M. majus* est très sensible aux 2 strobilurines testées dans cette étude, la dimoxystrobine et l'azoxystrobine. En revanche, la souche Mm 2 est très résistante à ces 2 strobilurines, puisque les valeurs de Facteur de Résistance de cette souche pour ces 2 molécules sont supérieures à 100. Ce résultat suggère qu'elle porte la mutation G143A au niveau du gène du cytochrome b, qui est la cible des fongicides de la famille des Qols. D'autre part, il est important de noter que la dimoxystrobine est 4,2 fois plus efficace que l'azoxystrobine *in vitro* à l'encontre de la souche Mm1 de *M. majus*.

1.3.2.1.2 Fongicides de la famille des inhibiteurs de la C₁₄ déméthylase (IDM)

Parmi les 3 molécules appartenant à la famille des inhibiteurs de la C₁₄ déméthylase (IDM), nos résultats montrent que le prothioconazole est plus efficace que l'époxiconazole, lui-même plus efficace que le tébuconazole à l'encontre de *M. majus* (Tableau 1). A l'exception du tébuconazole, les 2 autres molécules de cette famille chimique sont sensiblement aussi efficaces *in vitro* à l'encontre de la souche de *M. majus* sensible aux Qols (Mm1) et de celle qui est résistante (Mm2).

1.3.2.1.3 Fongicide associant une strobilurine (Qol) et un inhibiteur de la C₁₄ déméthylase (IDM)

Le fait d'associer une molécule appartenant à la famille des inhibiteurs de la C₁₄ déméthylase (IDM) à une molécule de la famille des Qols et plus particulièrement aux strobilurines permet de contrôler efficacement *in vitro* aussi bien la souche de *M. majus* sensible aux Qols (Mm1), que la souche résistante (Mm2) à cette famille chimique.

1.3.2.2 Evaluation de l'efficacité *in vitro* des différents fongicides à l'encontre de *F. graminearum* et de *F. culmorum*

1.3.2.2.1 Fongicides de la famille des Qols

Dans nos résultats (Tableau 1) la dimoxystrobine n'a aucune activité *in vitro* à l'encontre des souches de *F. graminearum* et de *F. culmorum* testées. Quant à l'azoxystrobine, elle présente un niveau d'activité très faible à l'encontre de la souche Fc2 de *F. culmorum*, mais ne contrôle pas du tout la souche Fg1 de *F. graminearum*.

1.3.2.2.2 Fongicides de la famille des inhibiteurs de la C₁₄ déméthylase (IDM)

La souche Fc2 de *F. culmorum* présente un niveau de sensibilité comparable au prothioconazole et à l'époxiconazole, alors qu'il est beaucoup plus faible au tébuconazole (Tableau 1).

En ce qui concerne la souche Fg1 de *F. graminearum*, l'activité *in vitro* du tébuconazole est légèrement supérieure à celle de l'époxiconazole, qui s'avère lui-même plus efficace que le prothioconazole.

1.3.2.2.3 Fongicide associant une strobilurine (Qol) et un inhibiteur de la C₁₄ déméthylase (IDM)

Le fait d'associer une molécule appartenant à la famille des inhibiteurs de la C₁₄ déméthylase (IDM) à une molécule de la famille des Qols permet de contrôler efficacement *in vitro* aussi bien la souche Fc2 de *F. culmorum*, que la souche Fg1 de *F. graminearum*.

1.3.2.3 Détermination du type d'interaction existant entre l'époxiconazole et la dimoxystrobine utilisés en mélange

Tableau 2 : Evaluation du type d'interaction existant entre l'époxiconazole et la dimoxystrobine utilisée dans le mélange (507F) à l'encontre de 4 souches de champignons

Table 2: Evaluation of the existing interaction between epoxiconazol and dimoxystrobin included in the ready mix fungicide 507F against 4 strains of fungus.

Paramètres	Souche Mm1	Souche Mm2	Souche Fc2	Souche Fg1
DE _{50obs}	0.035	0.67	0.35	0.96
DE _{50th} ^a	0.020	0.97	0.83	1.96
R ^b	0.58	1.45	2.38	2.04

^aLe ratio entre l'époxiconazole et la dimoxystrobine dans le 507F est de 1 pour 2,66 (50 g/l d'époxiconazole et 133 g/l de dimoxystrobine). La DE₅₀ des souches Mm2, Fc2 et Fg1 étant > 40 µg/ml pour la dimoxystrobine utilisée seule, la valeur de la DE₅₀ pour ce produit a été fixée arbitrairement à 50 pour calculer la DE₅₀ théorique du mélange.

^bR = DE_{50th}/DE_{50obs}

La méthode de Wadley est utilisée pour calculer la DE₅₀ théorique des 2 souches de *M. majus*, celle de *F. culmorum* et de *F. graminearum* pour le 507F, puis le niveau d'interaction R.

1.3.2.3.1 A l'encontre de *Microdochium majus*

Les résultats obtenus montrent qu'époxiconazole et dimoxystrobine utilisés en mélange prêt à l'emploi interagissent de manière additive (0,5 > R < 1,5) et ce pour les 2 souches de *M. majus* testées (Tableau 2). Cependant, il faut noter que la valeur du niveau d'interaction (R) obtenue pour la souche Mm1 sensible au Qol est proche de 0,5 alors que pour la souche Mm2, résistante aux Qols, elle est proche de 1,5.

1.3.2.3.2 A l'encontre de *F. culmorum* et de *F. graminearum*

Les résultats obtenus montrent clairement que l'époxiconazole et la dimoxystrobine utilisée en mélange prêt à l'emploi interagissent de manière synergique (R > 1,5) aussi bien pour la souche Fc2 de *F. culmorum* que pour la souche Fg1 de *F. graminearum* (Tableau 2).

1.4 Discussions et Conclusions

Les résultats de notre étude montrent que:

1. La dimoxystrobine, strobilurine de dernière génération, apparaît plus efficace à l'encontre de la souche sensible de *M. majus* que l'azoxystrobine. En revanche, ces 2 molécules ne sont plus du tout efficaces *in vitro* à l'encontre d'une souche de *M. majus* porteuse de la mutation G143A.
2. La dimoxystrobine ne présente aucune activité *in vitro* à l'encontre de la souche de *F. culmorum* et *F. graminearum* testées dans notre étude. Ce résultat est très surprenant dans la mesure où cette strobilurine de dernière génération est la seule dans cette famille chimique à présenter normalement une activité à l'encontre de ce groupe de champignons. On peut se demander si cette absence d'efficacité observée *in vitro* est réelle ou s'il s'agit d'un problème technique lié par exemple au milieu utilisé ?
3. Afin de répondre rapidement à cette question essentielle, il est envisagé de tester l'efficacité de la dimoxystrobine *in planta* sur fragments de feuilles de blé maintenus en survie et inoculés par *F. culmorum* et/ou *F. graminearum*. L'utilisation d'une gamme de concentration en dimoxystrobine devrait permettre de valider si la dimoxystrobine présente effectivement une certaine efficacité à l'encontre des *Fusarium sp.* Nous devrions alors nous orienter vers la recherche et l'utilisation d'un autre milieu de culture permettant d'évaluer la sensibilité des souches de *Fusarium spp.* à cette strobilurine.
4. L'époxiconazole présente un niveau d'efficacité *in vitro* non négligeable aussi bien vis-à-vis de *M. majus*, que de *F. culmorum* et de *F. graminearum*. Le niveau d'activité *in vitro* de cette triazole "haut de gamme" n'est pas très éloigné de celui du prothioconazole, triazole de dernière génération, dont l'activité anti-*Microdochium* et *Fusarium sp* est parfaitement connue.

5. Le 507F, mélange prêt à l'emploi d'époxiconazole et de dimoxystrobine, présente un bon niveau d'efficacité *in vitro* à l'encontre de la souche sensible aux Qols de *M. majus*, mais également de la souche résistante aux Qols de cet agent pathogène. D'autre part, ce mélange présente aussi un bon niveau d'activité *in vitro* à l'encontre de *F. culmorum* et de *F. graminearum*.
6. L'activité relativement élevée du 507F observée *in vitro* s'explique vraisemblablement par le bon niveau d'activité de l'époxiconazole à l'encontre de la souche de *M. majus* résistante aux Qols, mais aussi des 2 souches de *F. culmorum* et *F. graminearum* testées dans cette étude. Si cela semble effectivement le cas pour *M. majus*, il n'en est pas de même pour les *Fusarium sp*, puisque l'utilisation de la méthode de Wadley nous a permis d'observer qu'il existe une interaction de type synergique entre l'époxiconazole et la dimoxystrobine pour la souche Fc2 de *F. culmorum* et Fg1 de *F. graminearum*. En revanche, seule une interaction additive a été révélée pour les 2 souches de *M. majus*.

1.5 Perspectives

Au vu des résultats de l'étude *in planta*, qui a permis de valider que la dimoxystrobine a une efficacité contre la souche de *F. graminearum* testée, nous n'avons pas répété cette étude sur *F. culmorum*, et des conclusions précédentes nous projetons pour les études suivantes de :

- Valider l'efficacité de la dimoxystrobine en utilisant un milieu adapté aux strobilurines. En effet les strobilurines bloquent la voie oxydative principale pour les champignons. Cependant il existe une seconde voie alternative que certains champignons utilisent lorsque la voie principale est insuffisante ou est bloquée. Ce mécanisme de survie ne permet pas aux champignons de survivre si aucune pression de sélection ne s'exerce sur eux. Par contre il est suffisant pour permettre leur développement dans les conditions de laboratoire. Il nous faudra donc utiliser un milieu contenant du acide salicylhydroxamique SHAM (Salicylhydroxamic acid) qui bloque cette seconde voie oxydative (Elitsur, 2002).
- Diversifier les souches et les espèces de champignons sur lesquels est testé l'efficacité des fongicides.

2 Analyse de différentes espèces et souches de *Fusarium* et *Microdochium* sur strobilurines et triazoles

2.1 MATERIEL ET METHODE

2.1.1 Méthode utilisée : méthode de sensibilité exacte

Le milieu de base est le PDA (Potato dextrose agar).

Pour les strobilurines, les matières actives des produits testés ont été additionnées au PDA selon les concentrations suivantes : 1 ; 0.5 ; 0.1 ; 0.05 ; 0.025 ; 0.0125 ; 0.00625 ; 0 ppm. Cette ligne de base a été sélectionnée selon les résultats obtenus lors de l'étude préliminaire de 2010.

Pour les triazoles, les matières actives des produits testés ont été additionnées selon les concentrations suivantes : 3 ; 1.5 ; 0.5 ; 0.3 ; 0.1 ; 0.03 ; 0.01 ; 0 ppm. Cette ligne de base a été inspirée par le protocole « GIBBZE_microtiter_monitoring_method_BCS_2006_V1 » (Mehl, 2006) publié sur le site de la FRAC.

Dans toutes les boîtes (témoin et produits testés) une dose de 100 ppm de SHAM a été ajoutée.

Pour chaque produit et pour chaque dose, 3 répétitions ont été réalisées.

2.1.2 Souches testées

- *Fusarium* responsables des DONs, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* et *F. poae*
- *Fusarium* intervenant sur le rendement du blé : *F. crockwellense*, *Microdochium nivale* et *M. majus*

2.1.3 Produits testés et doses

Les produits contenant une substance active de la famille des strobilurines, PHF1014, 507F et la Réf.3 sont exposées à la gamme de dose suivante : 1 ; 0.5 ; 0.1 ; 0.05 ; 0.025 ; 0.0125 ; 0.00625 ppm.

Les deux triazoles Réf.1 et Réf.2 sont exposées à la gamme de dose suivante : 3 ; 1.5 ; 0.5 ; 0.3 ; 0.1 ; 0.03 ; 0.01.

2.2 RESULTATS

2.2.1 *Fusarium* responsables des DON

Tableau 3 : Evaluation de la CI_{50} de la dimoxystrobine et du fongicide 507F à l'encontre de 9 souches de champignons du groupe des *Fusarium* responsables de la production des DON

Table 3: Dimoxystrobin and epoxiconazol CI_{50} evaluation against 7 strains of *Fusarium* group of fungus producing DON mycotoxins

CI_{50}	PHF1014	507F	Réf.3	Réf.1	Réf.2
Souches de <i>Fusarium graminearum</i> Fg 09/04				0,26	1,44
Fg 275	19,35	2,27	66,74	1,01	0,57
Fg 304	77,33	5,49	19,06	1,00	0,54
Souches de <i>Fusarium culmorum</i> Fcu 1				0,10	1,12
Fc 2	0,14	0,15	0,11	0,13	0,08
Fcu 3				8,72	0,21
Souches de <i>Fusarium poae</i> Fp1	0,13	0,20	0,26	0,98	0,47
Fp2	52,93	0,62	0,18	1,50	0,83
Fp3	37,85	1,55	2,53	1,15	0,18

F. graminearum Pour les strobilurines, les CI_{50} et CI_{90} n'ont pas pu être calculés sur tous les produits testés car le développement des souches n'était pas suffisant. En effet, nous pouvons observer dans ce cas un développement proche entre le témoin et la dose maximale (Fg 09/4 et Fg 304 sur les strobilurines).

F. culmorum : Pour les souches Fcu1 et Fcu3, les CI_{50} et CI_{90} n'ont pas pu être calculées pour les strobilurines.

F. poae : La croissance des trois souches sur le PHF1014 permet de calculer les CI_{50} mais elle n'est pas suffisamment significative sur les différentes doses. Nous ne pouvons pas véritablement observer une inhibition.

2.2.2 *Fusarium* intervenant sur le rendement du blé

Tableau 4 : Evaluation de la CI_{50} de la dimoxystrobine et du fongicide 507F à l'encontre de 7 souches de champignons du groupe des *Fusarium* intervenant sur le rendement du blé

Table 4: Dimoxystrobin and epoxiconazol CI_{50} evaluation against 7 strains of *Fusarium* group of fungus with a yield impact

	CI_{50}	PHF1014	507F	Réf.3	Réf.1	Réf.2
Souche de <i>Fusarium crockwellense</i>	Fcr1	58,49	22,77	0,00846	5,69	0,74
	Fcr2	0,02	1,51		0,50	1,07
	Fcr3	0,10	0,01	0,01	1,33	0,35
Souche de <i>Microdochium nivale</i>	Mn 09/1		0,83		0,14	12,53
	Mn 1	0,01	0,02	0,01	0,31	1,21
	Mn 08	0,01	0,01	0,02	0,25	0,59
<i>Microdochium majus</i>	CI_{50}				0,43	10,11

F. crockwellense : La gamme de dose choisie n'est pas du tout adaptée au *F. crockwellense*. L'inhibition de la croissance des différentes souches sur la gamme dose n'est pas significative.

M. nivale : Pour la souche Mn 09/1, les CI_{50} sur le PHF1014 et Réf.3 n'ont pas pu être calculées.

M. majus : La gamme de dose de strobilurines n'est pas adaptée à la croissance de la souche. Nous n'avons pas pu calculer les CI_{50} pour cette famille de produit.

2.3 CONCLUSIONS

Les gammes de doses utilisées ne sont pas adaptées aux strobilurines. Nous devons travailler avec une nouvelle gamme de doses pour avoir des résultats interprétables pour les trois souches de *F. graminearum*, *F. poae* et *F. crockwellense*, deux souches de *F. culmorum*, la souche de *M. nivale* et de *Microdochium majus*. Nous avons choisi de travailler avec une gamme large de doses 0 ; 0.1 ; 0.3 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30 ; 100 ppm pour être capable de prendre en compte la diversité des sensibilités que nous pourrions rencontrer dans le futur.

3 Etude avec une gamme large de doses

3.1 Matériel

3.1.1 Souches

F. graminearum : FU 11014, *F. culmorum* : FU 10002, *F. poae* : FU 10004

3.1.2 Fongicides et doses

- dimoxystobine PHF1014 et epoxiconazole Réf.1
- Doses utilisées : 0 ; 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30 ; 100 ppm
- 100 ppm de SHAM sont ajoutés dans chaque dose y compris le témoin sans fongicide.

3.1.3 Milieux utilisés

PDA et SNA pour le repiquage et le milieu Leroux (Leroux & Walker, 2011) et (Leroux, Chapeland, Desbrosses, & Gredt, 1999) pour les tests avec fongicides

3.2 Résultats

La CI_{50} est calculée à partir de la mesure de 30 tubes germinatifs par souche et par dose de produit.

Tableau 5 : Evaluation de la CI_{50} de la dimoxystrobine et de la réf.1 à base d'époxiconazole à l'encontre de 3 souches de champignons du groupe des *Fusarium*

Table 5: dimoxystrobin and epoxiconazol CI_{50} evaluation against 3 strains of *F. group of fungus*

	Réf.1 (ppm)		PHF1014 (ppm)	
	CI 50	CI 90	CI 50	CI 90
<i>F. graminearum</i> : FU 11014	0,945065169	113,7247236	0,054172752	281007,4915
<i>F. culmorum</i> : FU 10002	3,318592473	1356,881135	6,771700111	6121,280306
<i>F. poae</i> : FU 10004	0,329221961	31,52779484	5,62711E-05	735,2134185

3.3 Conclusion et perspectives

Cette nouvelle gamme de dose permet de calculer CI_{50} et CI_{90} pour les souches testées, que ce soit pour les substances actives de la famille des triazoles ou pour les substances actives de la famille des strobilurines. Elle sera gardée pour les études suivantes.

Ces résultats nous permettraient maintenant d'étendre nos études à un plus grand nombre de substances actives triazoles et/ou strobilurines et à un plus grand nombre de souches de champignons responsables des maladies de l'épi. Un dernier verrou technologique doit être levé, pouvoir standardiser les mesures et les décaler dans le temps. Ce sera l'objet de la dernière mise au point évoquée dans cet article.

4 Mesure de l'élongation des tubes germinatifs par microscopie et caméra.

4.1 Problématique

La mesure en direct des élongations de tubes germinatifs au bout des 15 heures d'incubation est coûteuse en temps d'observation, ce qui limite le nombre de modalités que nous pouvons tester sans introduire de biais par un décalage trop important de l'observation. Pour pallier à cette limite, nous allons dans cette dernière partie de méthodologie utiliser une caméra installée sur le microscope de façon à réaliser les mesures sur les clichés et non plus directement dans l'oculaire.

4.2 OBJECTIF

Calculer la CI_{50} de différents fongicides grâce aux mesures d'élongation de tubes germinatifs de spores de *Fusarium spp.* en améliorant la précision des mesures par l'utilisation d'une caméra sur le microscope.

4.3 MATERIEL ET METHODE

4.3.1 Souches

Les souches utilisées sont d'origine ARVALIS: *F. graminearum* (FU 11014), *F. culmorum* (FU 10002), *F. poae* (FU 10004).

4.3.2 Milieux

Les milieux PDA et SNA sont utilisé pour le repiquage et la sporulation.

Le milieu Leroux est utilisé avec les fongicides pour réaliser la gamme de dose.

Pour les boîtes de gamme de dose, ajouter les fongicides aux différents concentrations ainsi que 100 ppm de SHAM. Pour les boîtes témoins, ajouter également 100 ppm de SHAM.

4.3.3 Fongicides

La gamme de dose pour tous les fongicides testés est : 0 ; 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30 et 100 ppm.

Tableau 6 : Liste des spécialités testées dans l'étude

Table 6: List of products tested in the study

Fongicide	Molécule active	Form.	Concentration (g/l ou %)
Réf.2	tébuconazole	EW	250 g/L
Réf.1	époxyconazole	EC	83 g/L
PHF1107	dimoxystrobine	SC	15,90%
Réf.5	metconazole	SL	90 g/L
Réf.4	prothioconazole	EC	250 g/L
507F	époxyconazole 50g/L	SC	183 g/L
	dimoxystrobine 133g/L		
507F + Réf.5	époxyconazole 50g/L	SC	183 g/L
	dimoxystrobine 133g/L		
	metconazole	SL	90 g/L

4.4 RESULTATS

Tableau 7 : Evaluation de la CI_{50} de la dimoxystrobine et de la réf.1 à base d'époxyconazole à l'encontre de 3 souches de champignons du groupe des *Fusarium*

Table 7: Dimoxystrobin and epoxiconazol CI_{50} evaluation against 3 strains of *Fusarium* group of fungus

Fongicide	<i>F. graminearum</i> (souche FU 11014)		<i>F. culmorum</i> (souche FU 10002)		<i>F. poae</i> (souche FU 10004)	
	CI_{50} (ppm)	CI_{90} (ppm)	CI_{50} (ppm)	CI_{90} (ppm)	CI_{50} (ppm)	CI_{90} (ppm)
Réf.2	0,04	2,70	0,16	2,72	0,02	2,19
Réf.1	0,55	8,63	0,40	8,09	0,26	6,78
PHF1107	0,01	52,60	0,07	30726,29	$1,32E^{-03}$	0,02
Réf.5	$7,45E^{-05}$	0,99	$1,72E^{-04}$	0,27	$4,25E^{-04}$	3,10
Réf.4	0,01	3,92	$1,70E^{-04}$	0,32	0,02	2,41
507F	0,05	24,54	0,25	63,21	0,04	0,17
507F + Réf.5	$2,97E^{-03}$	0,55	0,04	2,81	$2,12E^{-04}$	0,48

4.5 COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS

D'un point de vue méthodologique, la croissance sur le témoin varie pour une même souche car l'étude a été réalisée en plusieurs étapes. A chaque étape le nombre de fongicides ou de champignons analysés était différent, et avec lui le temps de mesure variait. Un témoin a été introduit systématiquement dans chaque série de test pour pouvoir calculer les CI_{50} et CI_{90} en fonction du temps passé à la mesure.

La différence de croissance nous montre également que, même si un stockage à 4°C peut ralentir l'élongation du tube germinatif, elle ne l'arrête pas complètement.

Au cours de l'analyse des performances des différents fongicides, la dimoxystrobine solo se révèle efficace contre les différentes souches, à des niveaux équivalents aux références. L'époxiconazole solo fait également montre d'une grande efficacité *in vitro*. Le mélange des deux substances, présent dans le 507F, est lui-même très efficace et présente la particularité de limiter très fortement les valeurs extrêmes de CI_{90} que l'on peut retrouver dans certains cas. Cette tendance est confirmée dans le facteur où l'on retrouve en mélange dimoxystrobine, époxiconazole et metconazole. On peut supposer que ce dernier facteur est celui qui exerce le contrôle le plus régulier des tous les biotypes de champignons du type *Fusarium* et diminue la probabilité de sélection des populations résistantes. La mise au point méthodologique réalisée ouvre la possibilité de réaliser ces observations sur un grand nombre de souches. Nous pourrions ainsi valider la tendance à une diminution de la dispersion des résultats dans les mélanges de substances actives.

5 Conclusion et perspectives

Au plan méthodologique, l'analyse au laboratoire de l'activité de la dimoxystrobine (strobilurine) contre les champignons du genre des *Fusarium* et des *Microdochium* demande à ce que soit utilisé un milieu intégrant du SHAM de façon à bloquer la seconde voie oxydative des champignons. La prise en compte de la grande diversité des sensibilités observées nécessite l'utilisation d'une gamme très étendue de doses afin de calculer les CI_{50} et les CI_{90} de chacune des souches. Pour réaliser l'analyse simultanée des efficacités sur un grand nombre de souches et/ou des substances actives permises par l'utilisation de microplaques, l'utilisation d'une caméra permet de réaliser les clichés à la fin du temps d'incubation puis de mesurer l'allongement des tubes mycéliens sur les clichés.

Au plan des résultats, la dimoxystrobine a montré son efficacité au laboratoire contre les *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. crockwellense*, *Microdochium majus*, *M. nivale*.

Le mélange de dimoxystrobine et époxiconazole que l'on retrouve dans le 507F, est lui-même très efficace et présente la particularité de limiter très fortement les valeurs extrêmes de CI_{90} que l'on peut retrouver dans certains cas. Cette tendance est confirmée dans le facteur où l'on retrouve en mélange dimoxystrobine, époxiconazole et metconazole.

Cette avancée méthodologique nous permettra de valider cette tendance sur un plus grand nombre de souches de champignons.

6 Bibliographie

- Colby, S. R. (1967, Janvier). Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations. (W. S. Press, Éd.) Weeds, 15(1), 20-22.
- Elitsur, Y. (2002). Alternative Respiration., (pp. 1-16).
- Gisi, U., Binder, H., & Rimbach, E. (1985, Septembre). Synergistic interactions of fungicides with different modes of action. Transactions of the British Mycological Society, 85(2), 299-306.
- Leroux, P., & Walker, A.-S. (2011, Janvier). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science, 67(1), 44-59.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., & Gredt, M. (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana*. (Elsevier, Éd.) Crop Protection(18), 687-697.

- Mehl, A. (2006, Mai). GIBBZE microtiter monitoring method BCS 2006 V1, 1. Consulté le Septembre 15, 2015, sur FRAC: <http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/gibbze-microtiter-monitoring-method-bcs-2006-v1.pdf?sfvrsn=4>
- Wadley, F. M. (1967). The evidence required to show synergistic action of insecticides and a short cut in analysis. 1-333. (G. S. Press, Éd.) Washington, Etats Unis: US Department of Agrisulture, Bureau of Entomology and Plant Quarantine.