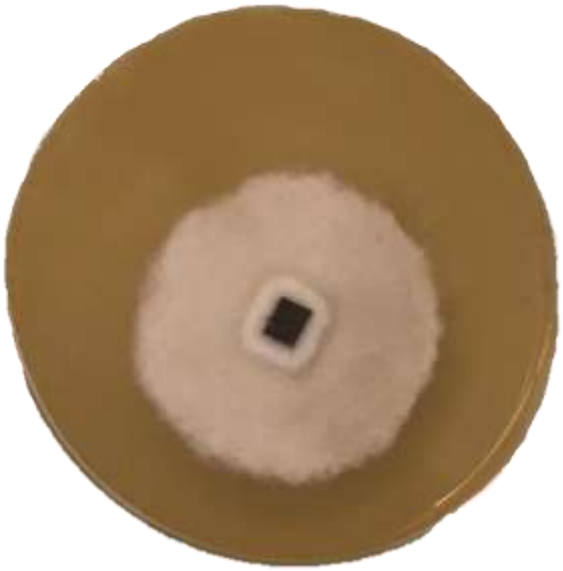
- Mémoire de stage -

Efficacité de produits phytosanitaires et de substances de base contre la moniliose



Monilia laxa

Encadrants : Mr Christophe RIONDET, Mr Cédric BERTRAND et Mr Léo PICAMAL

Andréa COZETTE

Master 1 – Chimie Environnementale et Écologie Chimique

Année universitaire : 2021 – 2022

Table des matières

INTRODUCTION 4

ETAT DE L'ART 4

MONILIOSE 4

LES PRODUITS TESTES 5

Les produits phytosanitaires 5

Les substances de base 7

MATERIELS ET METHODES 8

MATERIEL FONGIQUE 8

MATERIEL VEGETAL 8

PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE ET DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE 8

EXTRACTION, ISOLATION ET OBSERVATION DES MOISISSURES ISSUES DES NOYAUX MOMIFIES 9

PREPARATION DES SOLUTIONS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES 9

Substances actives non biologiques 9

Substances actives biologiques 9

DETERMINATION DES CONCENTRATIONS DES SOLUTIONS DE SUBSTANCES DE BASE 10

PREPARATION DES SOLUTIONS DE SUBSTANCES DE BASE 10

Prêle des champs et Ortie 10

Lécithines de soja 10

Ail 10

Écorce de saule 10

ANALYSE LC-HRMS-QTOF DES PURINS DE PRELE ET D'ORTIE 10

Préparation des échantillons 10

Paramètres LC-HRMS-QTOF 11

LES DIFFERENTS TESTS EFFECTUES 11

Intra gélose 11

Compétition/Concurrence 11

EVALUATION DE L'INHIBITION DES PRODUITS TESTES 11

TESTS SUR DES CONTAMINANTS D'INTERET 12

Isolation des contaminants 12

Mise en culture liquide 12

Tapis de moisissures 12

RESULTATS ET DISCUSSION 12

CHOIX DU MILIEU DE CULTURE 12

LES TESTS INTRA GELOSE SUR LA SOUCHE DE REFERENCE 13

Substances actives non biologiques 13

Concentrations de 100 et 1000 ppm (Sans filtration) 13

Concentrations de 25 – 50 – 75 et 100 ppm (Sans filtration) ... 13
Tests avec filtration des solutions ... 14
LES PRODUITS PHYTOSANITAIRES JULIETTA ET SERENADE ASO ... 15
Tests Intra gélose sur la souche de référence ... 15
Tests de Compétition/concurrence ... 15
CONCENTRATIONS EN MATIERE SECHE DES PURINS ET DECOCTIONS DE SUBSTANCES DE BASE ... 16
LES TESTS INTRA GELOSE DES SUBSTANCES DE BASE SUR LA SOUCHE DE REFERENCE ... 17
Ortie et Prêle ... *17*
Lécithine de soja, Ail et Écorce de saule ... *17*
COMPARAISON DE LA COMPOSITION DES PURINS COMMERCIAUX ... 17
EXTRACTION DES MOISISSURES DES NOYAUX MOMIFIES ... 18
LES TESTS INTRA GELOSE SUR LES SOUCHES ISSUES DES NOYAUX MOMIFIES ... 19
ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES CONTAMINANTS ... 20
CONCLUSION ... 21
PERSPECTIVES ... 21
BIBLIOGRAPHIE ... 22
ANNEXES ... 25
RESUME ... 32

Introduction

De nos jours, l'utilisation de produits phytosanitaires est très réglementée de par leur devenir et leur impact sur l'environnement. Le biocontrôle est une avancée majeure pour pallier à ce problème de grande ampleur. D'après le Ministère de l'Agriculture, « le biocontrôle est un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels. Seules ou associées à d'autres moyens de protection des plantes, ces techniques sont fondées sur les mécanismes et interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel. » [1]. Ainsi, leur utilisation permettrait de lutter contre les problématiques environnementales.

Dans le cas de cette étude, plusieurs produits phytosanitaires et substances de base ont été testés dans la lutte contre la moisissure *Monilia laxa*, une des moisissures responsables de la moniliose, une maladie pouvant entrainer jusqu'à 30 % de pertes [2]. Les substances de base comme l'ortie, la prêle, les lécithines de soja ou encore l'écorce de saule sont connues pour avoir des effets antifongiques mais elles sont dites substances de base car leur fonction première n'est pas de lutter contre les pathogènes.

Hormis l'avantage environnemental considérable de leur utilisation, les substances de base bénéficient d'une règlementation beaucoup plus souple et d'un coût moins élevé que les produits phytosanitaires commercialisés. De ce fait, les arboriculteurs pourraient traiter leurs cultures par leurs propres moyens et donc auraient un accès simplifié aux antifongiques.

Etat de l'art

Moniliose

La moniliose est une maladie causée par 3 moisissures : *Monilia fructigena*, *Monilia fructicola* et *Monilia laxa*. L'espèce *Monilia laxa* (Figure 1) est une moisissure du règne des *Fungi*, de l'embranchement des *Ascomycota*, de la classe des *Leotiomycetes*, de l'ordre des *Helotiales*, de la famille des *Sclerotiniaceae* et du genre *Monilia*. Cette moisissure touche les arbres de fruits à noyaux tels que les pêchers, abricotiers, pruniers ou encore cerisiers

Pendant l'hiver, les spores sont contenues dans les fruits pourris ou les fruits momifiés. Au printemps, les conditions climatiques (vent ou pluie) dispersent ces spores et les moisissures vont se développer sur les membres des arbres fragilisés par la grêle, les oiseaux ou encore les insectes [3].

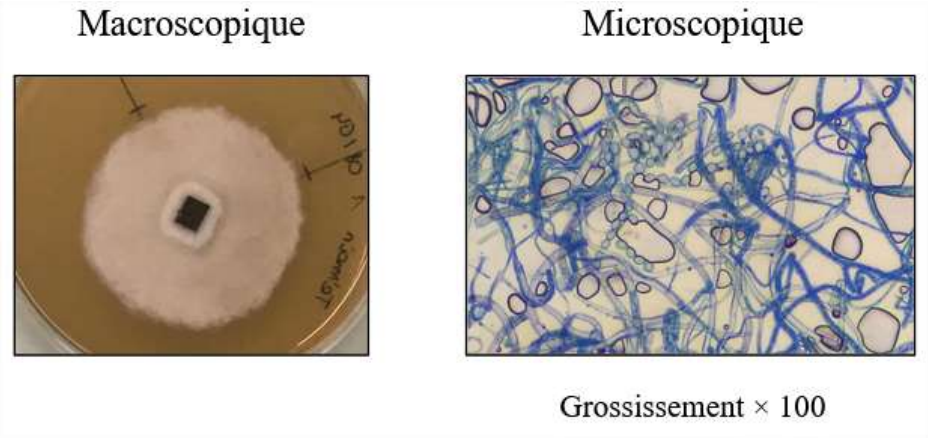


Figure 1 : Photos de *Monilia laxa* macroscopique et microscopique

D'un point de vue macroscopique, *M.laxa* est une moisissure blanche qui prend une teinte grise avec le temps et d'un point de vue microscopique, les spores de *M.laxa* peuvent être distinguées par leur forme allongée en citron (Figure 2). Pour finir, *M.laxa* peut être caractérisée par une distance courte entre son conidie et la première branche du tube germinatif contrairement à *M.fructigena* et *M.fructicola* [4].

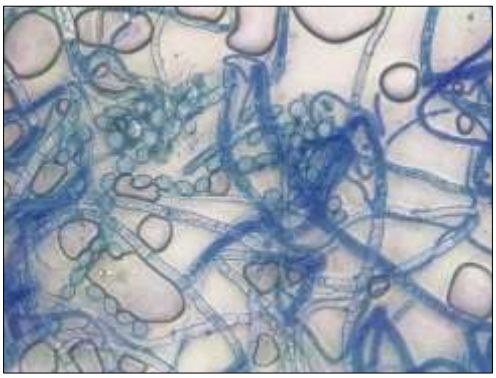


Figure 2 : Spores de *Monilia laxa*

Les produits testés

Les produits phytosanitaires

Dans ce sujet, il a été testé 9 produits phytosanitaires commercialisés et utilisés par les agriculteurs. Ces produits peuvent être des composés chimiques de synthèse, des micro-organismes ou encore de l'huile essentielle d'orange douce extraits de ces dernières.

L'Armicarb est un fongicide composé à 85% de bicarbonate de potassium. Le mode d'action de ce dernier va être d'inhiber les spores et les hyphes mycéliens [5] afin de limiter la croissance de la moisissure grâce à sa faculté déshydratante.

Le Difcor est composé de 250 g/L de diféconazole connu pour empêcher la sporulation des moisissures responsables de l'oïdium et de la moniliose [6].

Julietta est un biofongicide contenant 96,1 % de levures de *Saccharomyces cerevisiae* souche LAS02. Ce produit est à déployer au champ en prévention de la maladie de la moniliose car les levures de Saccharomyces cerevisiae vont coloniser le milieu et ainsi agir contre la moisissure responsable de la moniliose par compétition spatiale et nutritive [7].

Le Limocide est un fongicide à base de 85% d'huile essentielle d'orange douce qui lutte contre la moniliose en déshydratant le mycélium. Ainsi, l'application du Limocide permet de limiter la progression de la moisissure [8].

Le Luna Experience est composé de 200 g/L de fluopyram et 200 g/L de tébuconazole. Le fluopyram bloque la production d'énergie de la moisissure sur tous les stages du cycle de développement de celle-ci. Quant à lui, le tébuconazole est actif sur le développement du tube germinatif, la croissance du mycélium et la sporulation [9].

Le Merpan est un produit commercial contenant 80% de captane, une molécule qui va agir sur trois mécanismes de la cellule de la moisissure. Il va gêner la division cellulaire au niveau du noyau, stopper la production d'énergie au niveau des mitochondries et inhiber le développement de la cellule. De ce fait, le captane élimine le développement du mycélium et bloque la germination des spores, cellules reproductrices de la moisissure [10].

Serenade ASO est un produit contenant 14,1 g/L de bactérie *Bacillus subtilis* souche QST 713. Appliquée au champ, cette bactérie lutte contre la moisissure par compétition spatiale et nutritive [11]. De plus, les bactéries sécrètent des lipopeptides durant leur croissance. Ces lipopeptides altèrent le mycélium et les membranes cellulaires de la moisissure. Il peut donc être observé une zone d'inhibition empêchant la croissance de la moisissure [12] [13].

Le Signum est un fongicide composé de 26,7% de boscalide et 6,7% de pyraclostrobine. Pour lutter contre les moisissures responsables des maladies, l'application du Signum au champ a un effet tout au long du stade du développement de la moisissure. En effet, il stoppe la germination des spores, la production du tube germinatif, la croissance mycélienne et la sporulation [14].

Le Switch est un produit commercial contenant 375 g/kg de cyprodinil et 250 g/kg de fludioxonil. Ces 2 composés ont 2 rôles différents. Lors du développement du mycélium, le cyprodinil empêche la biosynthèse des acides aminés de la moisissure. De ce fait, la synthèse des protéines, aussi bloquée, entraîne la mort du micro-organisme. En revanche, le fludioxonil a une action au niveau des membranes. En effet, il bloque le transport des spores fongiques et inhibe alors la reproduction de la moisissure [15].

Les substances de base

Les substances de base testées ont été choisies car elles sont autorisées au niveau européen en arboriculture et sont connues pour avoir des capacités antifongiques. Cependant, comme ces substances n'ont pas comme fonction première d'être des antifongiques, on les nomme donc « substances de base ». Elles sont au nombre de six mais seulement quatre d'entre elles vont être testées car les tests effectués ne conviennent pas à l'hydroxyde de calcium et au bicarbonate de sodium qui ont plutôt un effet desséchant qui sera inactif sur un milieu composé d'un minimum de 80% d'eau. Les substances de base testées seront alors la prêle des champs, l'écorce de saule, l'ortie et la lécithine de soja et cela sans support végétal. Celles-ci sont répertoriées sur le site de l'ITAB [16] où il est aussi possible de retrouver toutes les recettes des préparations pour pouvoir utiliser les substances en tant que fongicides.

La prêle des champs *Equisetum arvense* est connue pour avoir « des propriétés fortifiantes pour les plantes, biostimulantes, antifongiques et répulsives » [17]. Dans une autre publication, il a été démontré que l'extrait de prêle des champs à 3% a des activités antifongiques sur plusieurs moisissures [18]. Tout comme l'extrait d'écorce de saule, l'extrait de prêle des champs est constitué de flavonoïdes qui pourraient avoir un effet déshydratant sur le mycélium de la moisissure [19].

L'écorce de saule *Salix alba*, aussi appelé osier, connaît 2 modes d'action différents. L'extrait d'écorce de saule contient de l'acide salicylique ayant un effet stimulant sur les mécanismes de défense des plantes [20]. De plus, il a la faculté d'agir sur l'humidité donc sur la croissance et le développement de la moisissure. Pour finir, il a été remarqué que l'acide salicylique seul connaît moins de succès que l'extrait d'écorce de saule, ce qui laisse à penser que les autres polyphénols tels que les flavonoïdes retrouvés dans l'extrait auraient aussi une activité non négligeable [19].

L'extrait d'ortie *Urtica dioica* a été testé sur plusieurs moisissures et une activité antifongique a été reconnue [21]. En ce qui concerne *Monilia laxa*, l'extrait d'ortie à 10g/L a démontré qu'il y avait une réduction de la croissance du mycélium [22].

Les lécithines sont des phospholipides principalement extraits du soja ou du tournesol. Elles permettent d'augmenter le système de défense des plantes qui va engendrer une diminution de la production des cellules reproductrices de la moisissure [23].

Pour finir, la décoction d'ail *Allium sativum* va être testée. L'ail ne fait pas partie des substances de base mais en revanche, il est connu pour avoir des effets antifongiques. En effet, la décoction d'ail contient de l'allicine qui se révèle avoir une activité antifongique qui aura pour rôle de

« réduire la croissance de l'organisme, inhiber la synthèse des lipides, des protéines et des acides nucléiques » [24] [25] et des flavonoïdes précédemment vu pour son rôle déshydratant.

Matériels et Méthodes

Matériel fongique

Les tests d'efficacité des produits phytosanitaires et des substances de base ont été effectués sur plusieurs souches. La première était une souche de *Monilia laxa* de référence isolée par l'entreprise « AkiNaO » (Perpignan, France). Tandis que les autres étaient issues de noyaux de pêches momifiés ayant été prélevés sur 3 sites différents dans les Pyrénées-Orientales (66) (Tableau 1).

Tableau 1 : Provenance des noyaux de fruits momifiés

Site	**A**	**B**	**C**
Lieu	Ille-sur-Têt	Saint-Michel-de-Llotes	Montagne au Sud d'Ille-sur-Têt

Matériel végétal

Les purins de prêle et d'ortie ont été achetés dans des jardineries. Les 3 purins d'ortie sont de la marque « La tradition du jardinier », « Naturen » et « Botanic ». Concernant la prêle, les 2 purins sont de la marque « La tradition du jardinier » et « Or brun » tandis que la décoction est de la marque « Or brun ».

L'ail provenait d'un même lot acheté en commerce de proximité tout comme la lécithine de soja de la marque « Naturen ». Quant à elle, l'écorce de saule blanc provenait d'une pharmacie et est de la marque « Laboratoires Iphym ».

Préparation des milieux de culture et de l'eau physiologique

En vue de cultiver des souches de *Monilia laxa*, 3 milieux de culture différents ont été préparés. Ces milieux sont le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), le milieu RAA (Raisin Avec Antibiotiques) et le milieu RSA (Raisin Sans Antibiotiques).

Pour un litre de milieu PDA, 39 g de PDA ont été solubilisés dans 1 L d'eau distillée. Concernant la préparation du litre de gélose RAA, elle a nécessité 10 g de peptone, 18 g d'agar, 0,5 g de chloramphénicol, 200 mL de jus de raisin et 800 mL d'eau distillée. Après agitation et solubilisation du mélange, le pH de celle-ci a été amené à 6,5 à l'aide de quelques pastilles d'hydroxyde de sodium. Dans le cas d'une gélose RSA, la préparation est identique en dehors de l'ajout des 0,5 g de chloramphénicol.

Pour finir, la préparation d'un litre d'eau physiologique a consisté à solubiliser 9 g de chlorure de sodium dans 1 L d'eau distillée. Cette solution a ensuite été amenée à un pH de 6,6 avec un léger ajout de soude à 1 M.

Pour finir, les milieux et l'eau physiologique ont été autoclavés à 121 °C pendant 20 min afin de les stériliser.

Extraction, isolation et observation des moisissures issues des noyaux momifiés

L'extraction des moisissures présentes dans les noyaux momifiés a été réalisée en immergeant un noyau dans 26 mL d'eau physiologique. Ensuite, le flacon a été agité pendant 10 minutes sur un agitateur vibrant (vitesse 10) afin d'extraire le matériel fongique contenu dans les noyaux. Le surnageant a ensuite été dilué 10, 100 et 1000 fois dans de l'eau physiologique puis 500 µL de chaque dilution ont été étalés au râteau sur des géloses RAA préalablement coulées et refroidies. Après croissance des moisissures pendant quelques jours, les moisissures d'intérêts ont été prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile puis isolés sur une gélose RAA.

Durant leur période de croissance, les moisissures ont été soumises à une température et une luminosité ambiante. Quand leurs croissances ont été relativement avancées, les moisissures ont été observées au microscope. Pour cela, il a été pratiqué la « technique du drapeau ». Cette dernière a consisté à placer délicatement un morceau de ruban adhésif sur la moisissure afin de prélever du matériel fongique puis celui-ci a été déposé sur une lame de verre surmontée d'une goutte de bleu de méthylène.

Préparation des solutions de produits phytosanitaires

Substances actives non biologiques

Les produits phytosanitaires contenant des substances actives non biologiques ont été préparés à différentes concentrations en solubilisant les masses pesées dans de l'eau distillée. À la suite des premiers résultats, certaines d'entre elles ont été stérilisées en les filtrant à 0,2 µm afin d'éliminer les contaminations qui ont entravé l'interprétation des résultats.

Substances actives biologiques

À la différence des produits phytosanitaires, les produits Julietta et Serenade contiennent des micro-organismes. De ce fait, la masse pesée a été solubilisée dans de l'eau physiologique.

Détermination des concentrations des solutions de substances de base

Pour déterminer la concentration en extrait de plantes de chaque solution de substances de base, des triplicats de ces solutions ont été lyophilisés afin de connaître la masse réelle d'extrait de plantes contenue dans les purins ou les décoctions testés.

Préparation des solutions de substances de base

Prêle des champs et Ortie

Selon la marque du purin de prêle ou d'ortie utilisée, les concentrations testées ont été différentes. Les purins d'ortie et de prêle de la marque « La tradition du jardinier » ont été testés à 100, 50 et 10 ppm. Concernant les 4 autres solutions de prêle et d'ortie, elles n'ont pas nécessité de dilution car elles ont été utilisées pures.

En revanche, toutes les solutions préparées ont été filtrées à 0,2 µm avant d'être ajoutées à la gélose afin d'éliminer les contaminants qui auraient pu nuire à l'interprétation des résultats.

Lécithines de soja

La lécithine de soja étant pure, 2 mL ont été solubilisés dans 50 mL d'eau distillée. La solution résultante a été chauffée à 60°C jusqu'à homogénéisation. Cette dernière a été expérimentée à 10, 50, 100 et 1000 ppm.

Ail

La décoction d'ail a été réalisée en épluchant et broyant 80 g d'ail frais grossièrement dans un mortier puis les ajouter ensuite dans 400 mL d'eau distillée. Après macération pendant 24h, la solution a été amenée à ébullition puis infusée pendant 30 min avec une légère agitation. Celle-ci a été testée pure, diluée 2 fois et diluée 10 fois.

Écorce de saule

La décoction d'écorce de saule a été préparée en infusant, à 80°C, 40 g d'écorce de saule dans 300 mL d'eau distillée dont le pH a été ajusté à 6,2. Une fois la solution refroidie, elle a été filtrée puis portée à ébullition pour enfin laisser infuser pendant 2 heures à une température avoisinant les 80°C. La décoction a été testée pure, diluée 2 fois et diluée 10 fois.

Analyse LC-HRMS-QTOF des purins de prêle et d'ortie

Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a nécessité la lyophilisation d'environ 7 mL des purins. Les masses résultantes ont été pesées puis un volume précis d'un mélange méthanol/eau (50/50) a été introduit pour solubiliser ses masses et atteindre une concentration de 10 mg/mL.

Ensuite, ces solutions ont été diluées 10 fois avec le même solvant afin d'obtenir une concentration finale d'1 mg/mL. Pour finir, elles ont été mises en vials en les filtrant avec des filtres en PTFE à 0,22 µm ainsi que le témoin (Méthanol/Eau – 50/50).

Paramètres LC-HRMS-QTOF

L'analyse LC-HRMS-QTOF s'est déroulée sur un appareillage du fournisseur MaXis Bruker couplé à une chaîne HPLC du fournisseur Vanquish Thermo. Il a été utilisé la colonne Phenomenex composée d'une phase polaire C18 (Longueur : 100 mm, Diamètre = 2,1 mm et Taille des particules = 1,6 µm).

Un volume de 2 µL a été injecté. Quant à elle, la phase mobile était composée de 2 solvants, de l'eau et de l'acétonitrile avec 1 % d'acide formique et a suivi un gradient pendant l'analyse.

L'analyse s'est portée sur une gamme de masse m/z comprise entre 80 et 1600 et ce, pour les deux modes d'ionisation ESI + et ESI -.

Les différents tests effectués

Intra gélose

Le test Intra gélose a concerné tous les produits phytosanitaires et a été effectué à des concentrations différentes. Ce test a consisté à introduire 500 µL de la solution phytosanitaire de concentration connue dans 20 ml de gélose. Le nouveau milieu a été homogénéisé grâce à un vortex puis coulé dans une boîte de Pétri. Quand ce dernier a figé, celui-ci a été ensemencé avec un cube de moisissure posé contre la nouvelle gélose.

Compétition/Concurrence

Le test Compétition/Concurrence a été réalisé sur le produit Julietta contenant des levures de *Saccharomyces cerevisiae* souche LAS02. Pour cela, des milieux de RSA ont été coulés puis une fois durcis, 100 µL de la solution testée ont été déposés dans un coin de la boîte de Pétri. Après une croissance de 24h des colonies, un cube de moisissure de *Monilia laxa* a été déposé contre la gélose dans le coin opposé de la colonie de levures.

Evaluation de l'inhibition des produits testés

Afin d'évaluer l'efficacité des produits phytosanitaires et substances de base testées, il a été utilisé une formule permettant de calculer un pourcentage d'inhibition à l'aide des relevés du témoin et des tests effectués.

$$Pourcentage\ d'inhibition\ (\%) = \frac{Témoin\ (mm) - Réplicat\ (mm)}{Témoin\ (mm)} \times 100$$

Tests sur des contaminants d'intérêt

Isolation des contaminants

Une isolation par stries a été effectuée afin de mettre en culture 3 contaminants pour tester leur intérêt antifongique. Le contaminant ciblé a été prélevé à l'aide d'une anse puis plongé dans 500 µL d'eau physiologique. Une fois le matériel vortexé, il a été prélevé à l'anse puis strié sur une gélose RSA afin d'être isolé.

Mise en culture liquide

Chacun des 3 micro-organismes isolés a été mis dans un erlen contenant 500 mL de milieu RSA liquide avec et sans présence de *Monilia laxa*. En effet, la présence de *Monilia laxa* a été simulée en ajoutant quelques cubes de gélose recouvert de moisissures dans les milieux liquides concernés. Les cultures liquides ont été agitées à 150 rpm pendant 2 jours puis chaque culture a été centrifugée.

Tapis de moisissures

Après centrifugation, les surnageants ont été récupérés puis stérilisés avec des filtres de 0,2 µm pour éliminer tous micro-organismes restants. Afin de tester l'activité antifongique des molécules sécrétées par ces micro-organismes, il a été réalisé un tapis de moisissures sur une gélose RSA en étalant au râteau 250 µL d'eau physiologique précédemment vortexée avec plusieurs cubes de moisissures *Monilia laxa*. Une fois le tapis de moisissures sec, les surnageants précédemment filtrés à 0,2 µm ont été dilués et 25 µL de chaque solution ont été déposés sur le tapis de moisissure à un endroit prédéfini (Annexe 1).

Résultats et Discussion

Choix du milieu de culture

Le choix du milieu de culture va se porter sur une gélose en convenance avec la croissance de *Monilia laxa*. Il s'est avéré que la croissance du mycélium était plus rapide sur RSA que sur PDA. Cette différence notable entre les 2 milieux de croissance étudié a pu être observé sur plusieurs jours (Figure 3). En effet, sur milieu RSA, la croissance est de 23,00 ± 1,75 mm au jour 7 contre une croissance de 2,83 ± 0,38 mm sur milieu PDA au jour 7.

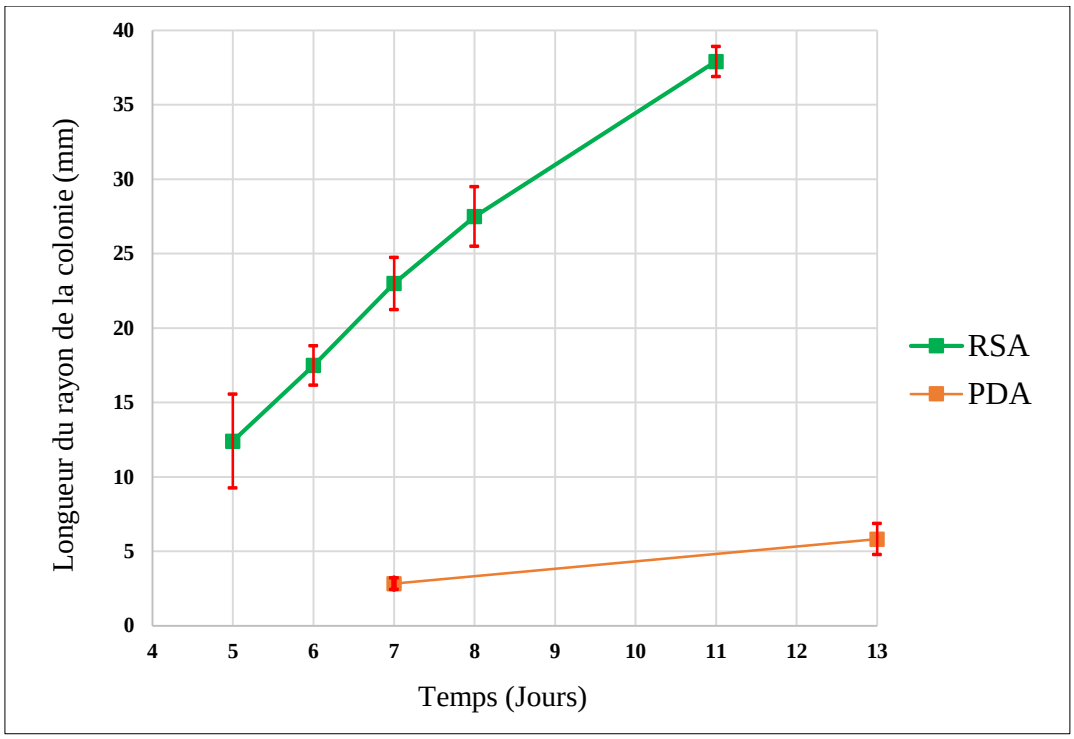


Figure 3 : Graphique de la longueur du rayon de la colonie *M.laxa* en fonction du temps sur PDA et RSA

Les tests intra gélose sur la souche de référence

Substances actives non biologiques

Concentrations de 100 et 1000 ppm (Sans filtration)

Les tests à 100 et 1000 ppm ont été effectués sur les géloses PDA et RSA. Les résultats ont montré une inhibition totale pour tous les produits sauf pour le Limocide et l'Armicarb. Cependant, il est important de rappeler que l'huile essentielle d'orange du Limocide et le bicarbonate de potassium contenu dans l'Armicarb ont pour effet de dessécher le mycélium et donc par conséquent de stopper la croissance des mycètes. Il peut donc en être conclu que la croissance de *Monilia laxa* était donc prévisible même en présence des produits phytosanitaires cités car pour rappel, la gélose est composée de minimum 80% d'eau. Il a donc été opté de ne pas poursuivre les tests sur ces 2 produits.

Concentrations de 25 – 50 – 75 et 100 ppm (Sans filtration)

Pour prolonger l'évaluation de l'efficacité des différents produits phytosanitaires, la gamme de concentrations a été diminuée pour arriver à des tests à 25, 50, 75 et 100 ppm sur gélose RSA.

Dans le cas des 5 produits phytosanitaires testés, il a pu être observé une inhibition totale. En revanche, certains tests ont présentés des contaminations. De ce fait, l'inhibition totale pourrait être due à la présence de ces micro-organismes. Ainsi, tout comme les tests effectués à 100 et 1000 ppm, le choix des prochains tests a été de diminuer les concentrations pour ces 5 produits

phytosanitaires mais en revanche, d'ajouter une étape de filtration stérilisante avant d'être mises dans la gélose pour éliminer les micro-organismes qui auraient pu être présents dans les solutions préparées ce qui permet de mettre en évidence l'effet spécifique des molécules actives.

Tests avec filtration des solutions

Les pourcentages des produits phytosanitaires aux concentrations testées ont été calculés puis mis sous forme de graphique en fonction des concentrations testées (Figure 4).

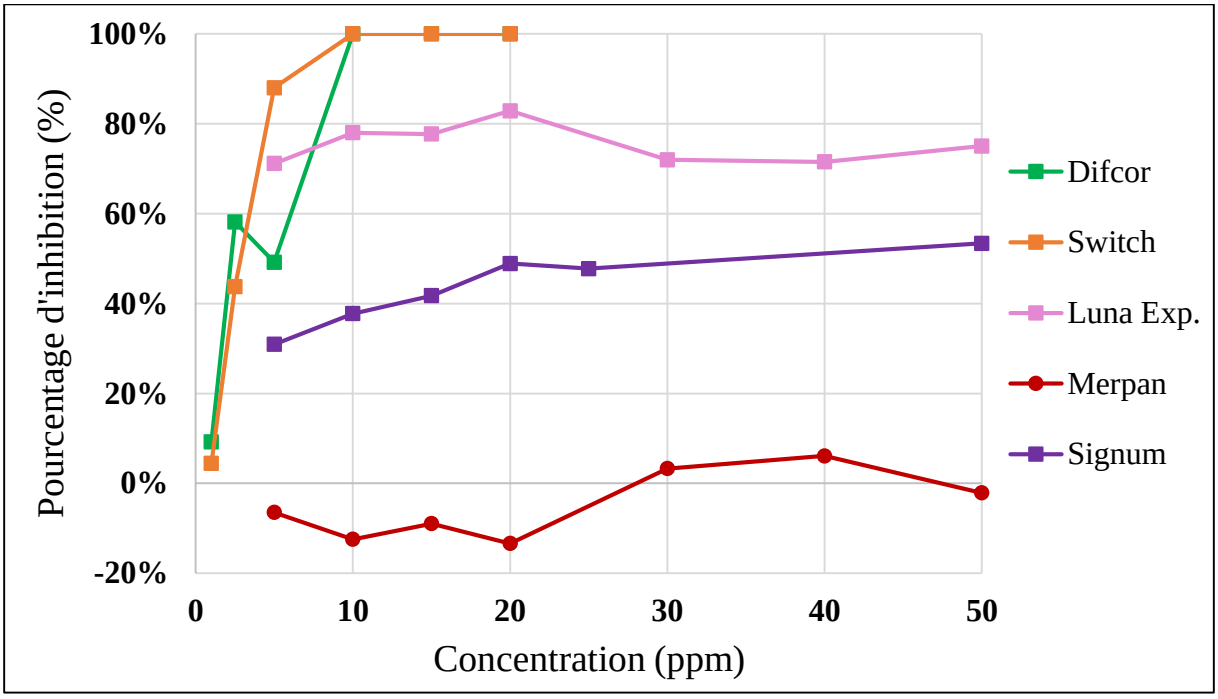


Figure 4 : Graphique du pourcentage d'inhibition des produits testés en fonction de leur concentration au jour 6

Sur le graphique en Figure 4, il a été noté que le Difcor et le Switch atteignaient une inhibition totale à 10 ppm au jour 6. En ce qui concerne le Luna Expérience, il semblerait que sa concentration n'ait pas joué de rôle car le pourcentage d'inhibition reste équivalent avec une moyenne d'environ 75% d'inhibition. Ensuite, le produit phytosanitaire Signum a montré un pourcentage d'inhibition faible par rapport aux produits phytosanitaires décrits précédemment avec un pourcentage d'inhibition maximum de 40% à 20 ppm au jour 6. Pour finir, le Merpan n'a pas présenté de résultats convaincants. En effet, aucune inhibition n'a été relevée quelle que soit la concentration testée. Cependant, ces pourcentages d'inhibition ont présenté des écart-types relativement important pour certains (Annexe 2). Il a donc été nécessaire de les prendre en compte afin d'interpréter les résultats obtenus.

Il est important de rappeler que ces tests ont été effectués avec des solutions de produits phytosanitaires préalablement filtrées. Cette filtration a présenté un réel avantage. En effet,

aucun micro-organisme ne pouvant résister à filtration, les tests ont pu être observés sans présence de micro-organismes pouvant altérer les résultats.

Cependant, cette filtration a pu biaiser la concentration testée en produits phytosanitaires car les solutions n'étant pas homogènes à cause de la solubilité des produits, le filtre a pu fausser la concentration car seulement la partie soluble a pu être filtrée. En revanche, il a donc été remis en cause les résultats de ces concentrations car les solutions n'ayant pas été filtrées, les micro-organismes contaminants ont pu avoir un effet sur l'inhibition.

Néanmoins, à mêmes concentrations, les produits phytosanitaires les plus efficaces sont le Difcor et le Switch. L'efficacité de Luna Experience et de Signum pour un pourcentage d'inhibition de 100% pourrait être étudiée à des concentrations plus élevées que celles testées dans cette partie. Pour finir, le Merpan nécessite aussi des concentrations plus élevées afin de présenter un début d'inhibition intéressant dans la lutte contre la moniliose.

Les produits phytosanitaires Julietta et Serenade ASO

Tests Intra gélose sur la souche de référence

Les tests Intra gélose sur la souche de référence avec les produits Julietta et Serenade ASO ont révélé une inhibition totale peu importe la concentration testée. En revanche, la concentration indiquée n'a pas de valeur car les micro-organismes se sont développés et reproduits dans la gélose. Alors l'hypothèse suivante a été soumise : les observations ne sont pas différentes car les micro-organismes se développent dans la gélose donc ils ont annulé les effets des dilutions et donc des différences de concentrations.

Tests de Compétition/concurrence

Les tests de Compétition effectués ont été plus représentatifs du mode d'action de Julietta et Serenade ASO. En effet, ces 2 produits phytosanitaires sont appliqués en préventif dans le but de faire de la compétition spatiale et nutritive avec la moisissure. Ainsi, ces tests ont été plus adéquats dans la recherche d'efficacité de ces produits.

Dans le cas des tests à 10 et 100 ppm de Serenade ASO, le mycélium de la souche de référence de *Monilia laxa* ne s'est pas développé sur les colonies et sa croissance a été empêchée grâce aux lipopeptides sécrétées par la bactérie (Figure 5).

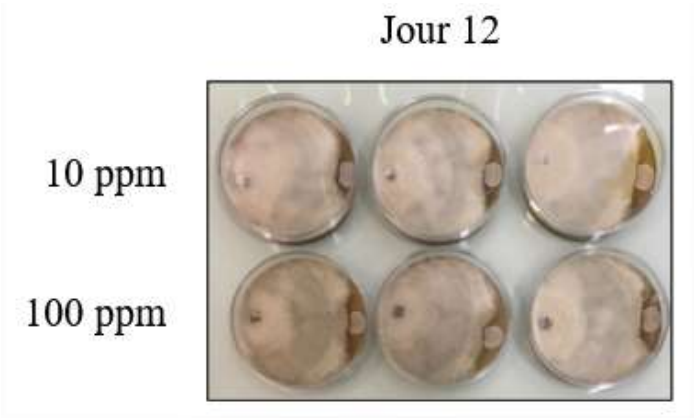


Figure 5 : Photo du test de compétition à 10 et 100 ppm de Serenade ASO au jour 12

En revanche, les tests à partir de levures provenant du produit phytosanitaire Julietta ont révélé qu'à 100 ppm, la moisissure a pris le dessus sur les petites colonies (milieu de boîte de Pétri) mais pas sur la grosse colonie (à droite de la boîte de Pétri) visible sur la Figure 6. En effet, au jour 7, les petites colonies étaient encore visibles au milieu de la boîte alors qu'au jour 22, la moisissure s'est développée sans pour autant envahir la colonie à droite de la boîte.

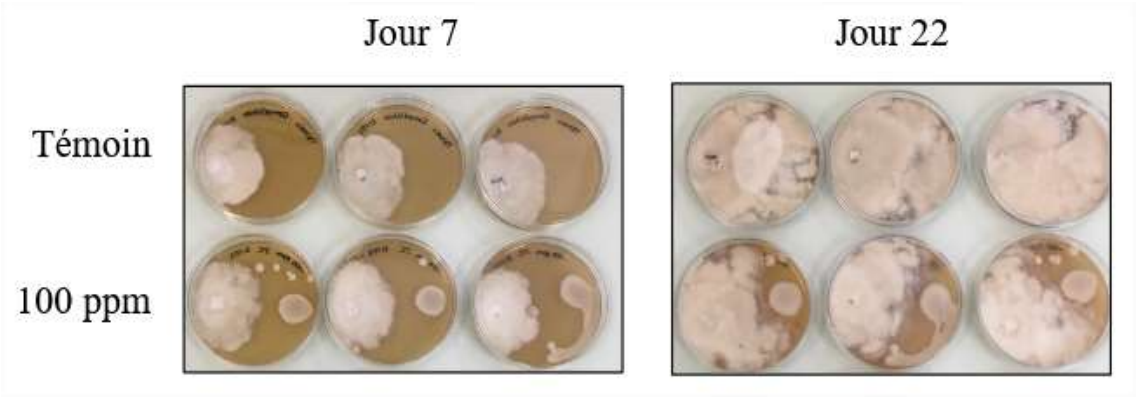


Figure 6 : Photo du test de compétition à 100 ppm de Julietta au jour 7 et 22

Concernant les produits Julietta et Serenade ASO, ils ont présenté une réelle efficacité contre la moniliose. En effet, les lipopeptides sécrétés par les bactéries *Bacillus subtilis* ont montré une forte zone d'inhibition. D'après les observations, les levures de *S.cerevisiae* sont efficaces contre la moisissure en présence d'une grande colonie.

Concentrations en matière sèche des purins et décoctions de substances de base

Après lyophilisation, les différentes concentrations des purins commerciaux et des décoctions ont été répertoriées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Concentrations des purins et des décoctions (ppm)

Prêle	La tradition du jardinier	5500 ppm	Ortie	La tradition du jardinier	4800 ppm
	Or brun	2200 ppm		Naturen	1000 ppm
	BHS	3100 ppm		Botanic	1500 ppm
Décoction d'ail		54 300 ppm	Décoction d'écorce de saule		3800 ppm

Les tests intra gélose des substances de base sur la souche de référence

Ortie et Prêle

Les tests avec les purins d'ortie et de prêle n'ont montré aucune activité antifongique contre la moisissure (Annexe 3). Ces résultats ont servi à établir le fait que l'ortie et la prêle ne sont pas des biocides. Cela sous-entend qu'ils n'agissent pas directement contre la moisissure. En revanche, d'autres tests pourraient permettre de démontrer que l'ortie et la prêle sont des stimulateurs de défense des plantes (SDP). Au contraire des biocides, les SDP vont agir sur la plante pour préparer la lutte contre le pathogène. Il a donc pu être conclu que les purins commerciaux ne sont pas efficaces envers la lutte directe contre la moniliose.

Lécithine de soja, Ail et Écorce de saule

Tout comme les résultats précédents, les tests intra gélose avec de la lécithine de soja, la décoction d'ail et la décoction de prêle n'ont pas révélé d'activité antifongique (Annexe 4).

La lécithine de soja est un stimulateur des défenses des plantes (SDP) donc l'activité antifongique de celle-ci directement sur la moisissure est cohérente car la lécithine a un effet sur la plante et non sur la moisissure.

En ce qui concerne les décoctions d'ail et d'écorce de saule, il a été vu dans l'état de l'art que la décoction d'écorce de saule contient de l'acide salicylique et que celle de l'ail contient des flavonoïdes qui auraient comme rôle de déshydrater la moisissure. Malheureusement, le haut taux d'humidité du milieu de culture ne permet pas de voir un effet significatif de ces asséchants.

Comparaison de la composition des purins commerciaux

Les analyses LC-HRMS-QTOF ont montré que les purins commerciaux possèdent des similitudes et des différences dans leurs compositions. En effet, la comparaison des spectres a souligné que les purins de prêle ont présenté des pics communs mais à des intensités différentes (Annexe 5a). Cela a signifié que les concentrations en métabolites sont hétérogènes entre les marques de purins. De plus, cette observation a été retrouvée dans le cas des purins d'ortie

(Annexe 5b). En ce qui concerne la comparaison des purins commerciaux de prêle et d'ortie, il a été remarqué que certains composés étaient communs aux purins commerciaux de prêle et d'ortie mais toujours à des quantités différentes (Annexe 5c).

Extraction des moisissures des noyaux momifiés

L'extraction et l'isolation des moisissures retrouvées dans les momies de noyaux ont démontré la présence de plusieurs moisissures.

A l'œil nu, les moisissures A2, A3, C1 et C3 (Annexe 6) n'ont pas présenté les mêmes caractéristiques physiques que la souche *Monilia laxa* de référence provenant de l'entreprise AkiNaO. Ces moisissures ont donc été exclues des tests suivants.

En revanche, les souches AM1, BM1 et BM2 ont un aspect assez similaire à la souche de référence d'AkiNaO (Figure 7).



Figure 7 : Photos des moisissures avec un aspect similaire à la souche référence

Ces souches ont donc fait l'objet d'une observation microscopique. Il est important de noter qu'une observation microscopique ne peut pas permettre d'identifier exactement l'espèce ou la classification des moisissures. Ici, l'objectif était de rechercher la présence de spores et de comparer leurs formes aux spores observées sur la souche de référence (Figure 8). Malheureusement, les observations n'ont pas permis de distinguer des spores (Annexe 7).

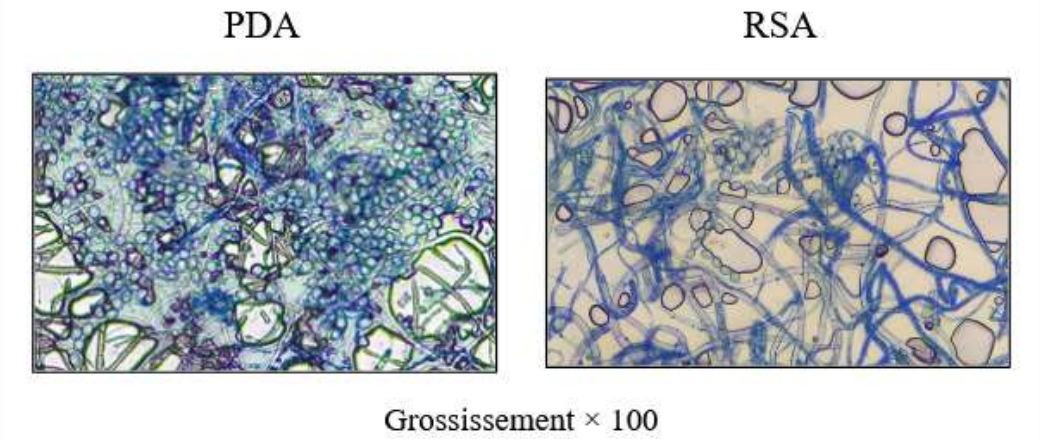


Figure 8 : Photos des observations microscopiques de la souche de référence sur PDA et RSA

Ainsi, la comparaison avec les spores en forme « citron » de la souche de référence n'a pas été possible. Cependant, les souches AM1, BM1 et BM2 ont été envoyées en identification dans le laboratoire de la santé des végétaux à Nancy afin d'être soumises à une identification.

Les tests intra gélose sur les souches issues des noyaux momifiés

Les tests Intra gélose sur les 3 moisissures issus des noyaux momifiés ont montré que les pourcentages d'inhibition ne sont pas significativement différents des pourcentages d'inhibition de la souche de référence (Figure 9).

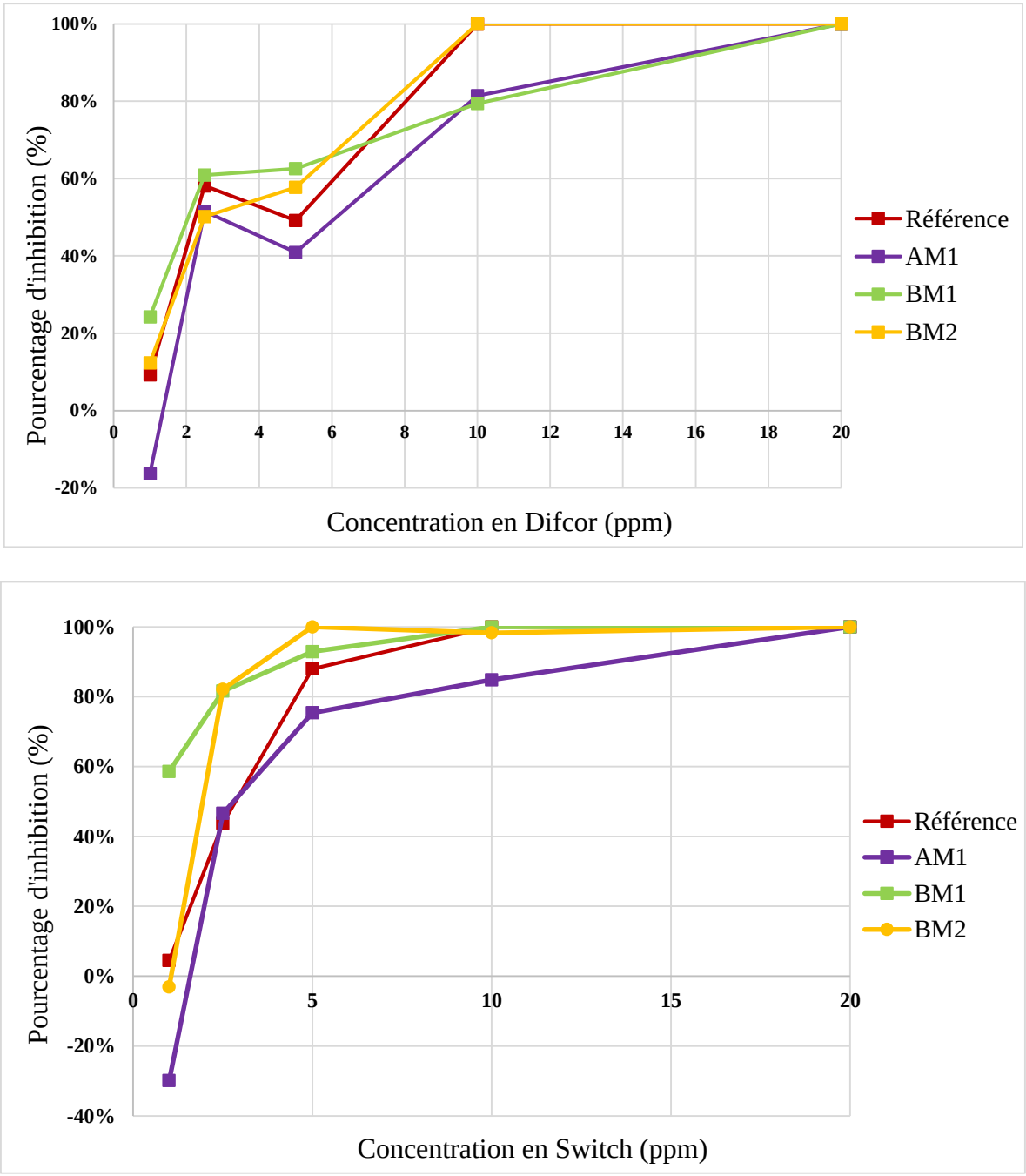


Figure 9 : Graphiques du pourcentage d'inhibition du Difcor et Switch en fonction des concentrations testées au jour 6 sur la référence et les 3 souches des noyaux momifiés

Sur la figure 9, les écarts-types ne sont pas affichés pour plus de compréhension mais ils varient de 0 à 35% pour le Difcor et de 0% à 25% pour le Switch. Ainsi, en prenant en compte les écarts-types, les pourcentages d'inhibition de chaque souche n'ont pas pu être distingués peu importe la concentration étudiée. Ces grandes valeurs d'écarts-types pourraient être dues à la croissance hétérogène des moisissures AM1, BM1 et BM2. En effet, elles ont été relevées sur seulement 2 axes perpendiculaires entre eux mais un relevé de toute la croissance du mycélium sur toute la surface de la boîte de Pétri et cela sur plusieurs réplicats aurait pu annuler ces biais expérimentaux. De plus, l'identification des moisissures n'étant pas certaine, la comparaison avec une souche de référence connue n'a été qu'hypothétique.

Activité antifongique des contaminants

Pendant les premières expérimentations, il a été observé des contaminants dans les boîtes de Pétri des tests Intra gélose des produits phytosanitaires à substances actives non biologiques et sur une des boîtes de Pétri contenant la souche de référence seule servant de matériel fongique. Ces 3 contaminants ont présenté une zone d'inhibition empêchant le développement du mycélium de *Monilia laxa* (Annexe 8).

Les tests avec les solutions obtenues des mises en culture des 3 micro-organismes isolés ont montrés que pour 2 d'entre eux, aucune activité antifongique des molécules secrétées par les contaminants n'avait été observée. En revanche, le contaminant IM a montré une activité antifongique (cercle rouge) au jour 4 à l'endroit du dépôt des solutions pures issues des cultures en présence et en absence de *Monilia laxa* (Annexe 9). En revanche, au jour 6, la moisissure a pris le dessus sur la zone traitée mais ce résultat a pu être expliqué par le fait que les lipopeptides se sont dilués dans la gélose ce qui a eu pour effet de diminuer leur concentration.

Cependant, afin de savoir si ces contaminants sont des souches de *Bacillus subtilis* issus du produit phytosanitaire Serenade ASO, les 3 contaminants récupérés ont été envoyés dans le laboratoire de la santé des végétaux à Nancy pour identification. Dans le cas d'une identification de *Bacillus subtilis*, la zone d'inhibition serait alors expliquée par la sécrétion de lipopeptides et il s'agirait donc de contaminations par la bactérie *Bacillus subtilis* du produit Serenade ASO.

Conclusion

Cette étude a permis d'explorer l'efficacité de plusieurs produits phytosanitaires avec des modes d'actions différents contre la moisissure *Monilia laxa*. En terme de substances actives non biologiques, il a pu être observé que le Difcor et le Switch présentent les inhibitions les plus importantes à 10 ppm. En revanche, en ce qui concerne les substances actives biologiques, le produit Serenade ASO a présenté une inhibition de la croissance de *M.laxa* notamment grâce aux lipopeptides sécrétés par les bactéries.

Perspectives

Le développement d'un protocole de dosage des concentrations en substances actives des produits phytosanitaires pourrait être réalisé afin de résoudre les biais causés par la filtration stérilisante. De plus, des tests « In campo » avec les substances de base dites stimulateurs de défense naturelles permettraient de démontrer leur activité stimulante de la défense des plantes traitées.

Pour finir, les identifications des contaminants d'intérêts isolés pourraient amener à d'autres recherches et tests afin de comprendre les phénomènes d'inhibition observés. Ces recherches seraient d'autant plus importantes si l'identification montre que les contaminants ne sont pas des bactéries de *Bacillus subtilis* provenant du produit Serenade ASO.

Bibliographie

[1] Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (2022) Qu'est-ce que le biocontrôle ? Site Internet. https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-le-biocontrole (consulté le 12 mars 2022).

[2] BASF. Les monilioses des fruits à noyau - Maladies des arbres fruits. https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/arboriculture/maladies_des_arbres_fruitiers/monilioses_du_pecher/ (consulté le 12 mai 2022).

[3] Bio en ligne (2019) Moniliose des fleurs (*Monilia laxa*) d'abricotier, cerisier, prunier. https://www.bio-enligne.com/lutte-biologique/521-moniliose.html (consulté le 12 mars 2022).

[4] De Cal A., Melgarejo P., (1999) Effects of Long-Wave UV Light on Monilinia Growth and Identification of Species, *Plant Dis.*, vol. 83, n° 1, p. 62-65.

[5] De Sangosse. Armicarb - Une substance naturelle contre l'oïdium et le botrytis. PDF. http://www.phytoservice.com/images/PDF/Notice-Armicarb.pdf (consulté le 2 mars 2022)

[6] Syngenta (2016) Score®250 EC. Site Internet. https://www.syngenta.ma/product/crop-protection/fongicide/scorer250-ec (consulté le 12 mars 2022).

[7] Agrauxine. Julietta. Site Internet. https://agrauxine.com/fr/produit/julietta/ (consulté le 2 mars 2022).

[8] Vivagro. Limocide - Fongicide Insecticide Acaricide naturel. Site Internet. https://vivagro.fr/produit/limocide/ (consulté le 11 mars 2022).

[9] Bayer (2022) Fongicides Luna® Expérience : Bayer-Agri, traitement phytopharmaceutique pour la protection des cultures - Luna® Expérience. Site Internet. https://www.bayer-agri.fr/produits/fiche/fongicides-luna-experience/ (consulté le 4 mars 2022).

[10] Adama (2017) Merpan SC - Le contact incontournable des arbres fruitiers. PDF. https://unealco.fr/wp-content/uploads/FT-100733-merpan.pdf (consulté le 4 mars 2022).

[11] Bayer. Fiche technique produit Serenade ASO / Rhapsody. PDF. www.smartbiocontrol.eu/wp-content/uploads/2021/04/06_SerenadeASORhapsody_FR.pdf (consulté le 12 mars 2022).

[12] Bayer. Notice Serenade. PDF. http://www.phytoservice.com/images/PDF/Notice-SERENADE-MAX.PDF (consulté le 3 mai 2022).

[13] Gingras R. Fiche technique Serenade ASO. PDF. https://www.agrireseau.net/phytoprotection/documents/Serenade%20Max.pdf (consulté le 5 mai 2022).

[14] BASF. Signum mode d'emploi. PDF. https://www.agro.basf.ch/fr/Documents/imported_media_files/ga_signum_de_FR.pdf?1629813582015 (consulté le 10 mars 2022).

[15] Syngenta. Switch.pdf . PDF. https://www.syngenta.ch/sites/g/files/zhg441/f/switch_f.pdf?token= 1623163011(consulté le 10 mars 2022).

[16] ITAB. Substances. Site Internet. http://substances.itab.asso.fr/ (consulté le 11 mars 2022).

[17] Marchand P. (2011) Activité antifongique de la prêle, ALTER AGRI, n° 110, p.25-26.

[18] Garcia D., Garcia-Cela E., Ramos A-J. et al. (2011) Mould growth and mycotoxin production as affected by Equisetum arvense and Stevia rebaudiana extracts. Food Control, vol. 22, nº 8, p. 1378-1384.

[19] Andreu V., Levert A., Amiot A., et al. (2018) Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming, Environ. Sci. Pollut. Res., vol. 25, nº 30, p. 29971-29982.

[20] Marchand P. (2015) Le saule ou osier, un SDN antifongique, ALTER AGRI, nº 130, p.31.

[21] Hadizadeh I., Peivastegan B. et Kolahi M., (2009) Antifungal activity of nettle (Urtica dioica L.), colocynth (Citrullus colocynthis L. Schrad), oleander (Nerium oleander L.) and konar (Ziziphus spina-christi L.) extracts on plants pathogenic fungi, Pak. J. Biol. Sci. PJBS, vol. 12, nº 1, p. 58-63.

[22] Feliziani E., Santini M., Landi L., et al., (2013) Pre-and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry, Postharvest Biol. Technol., vol. 78, p. 133-138.

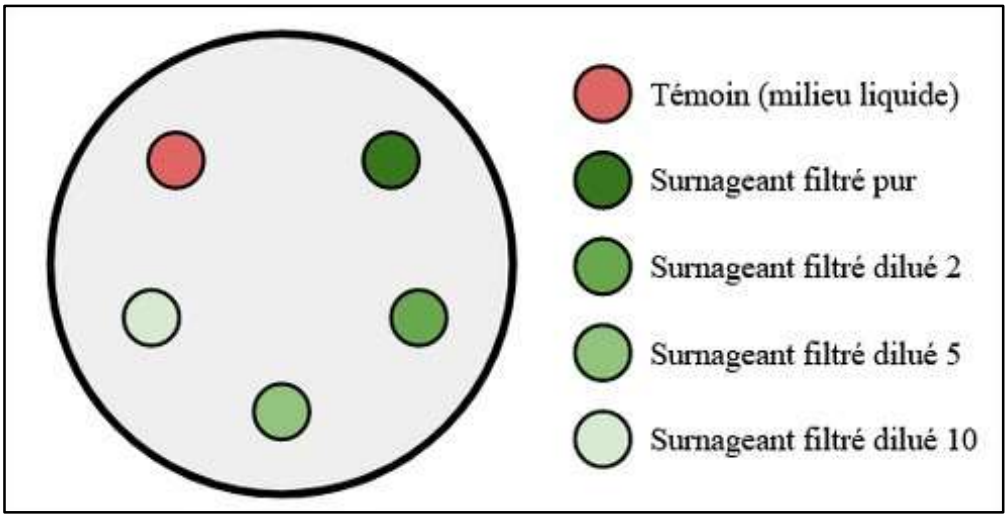
[23] Jolly M., Vidal R., (2018) Lecithins: A Food Additive Valuable for Antifungal Crop Protection, Int. J. Econ. Plants, vol. 5, nº 3, p. 104-107.

[24] J. C. Harris, S. L. Cottrell, S. Plummer, et al., (2001) Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, nº 3, p. 282-286.

[25] M. Adetumbi, G. T. Javor, et B. H. Lau. (1986) Allium sativum (garlic) inhibits lipid synthesis by Candida albicans. , *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 30, nº 3, p. 499-501.

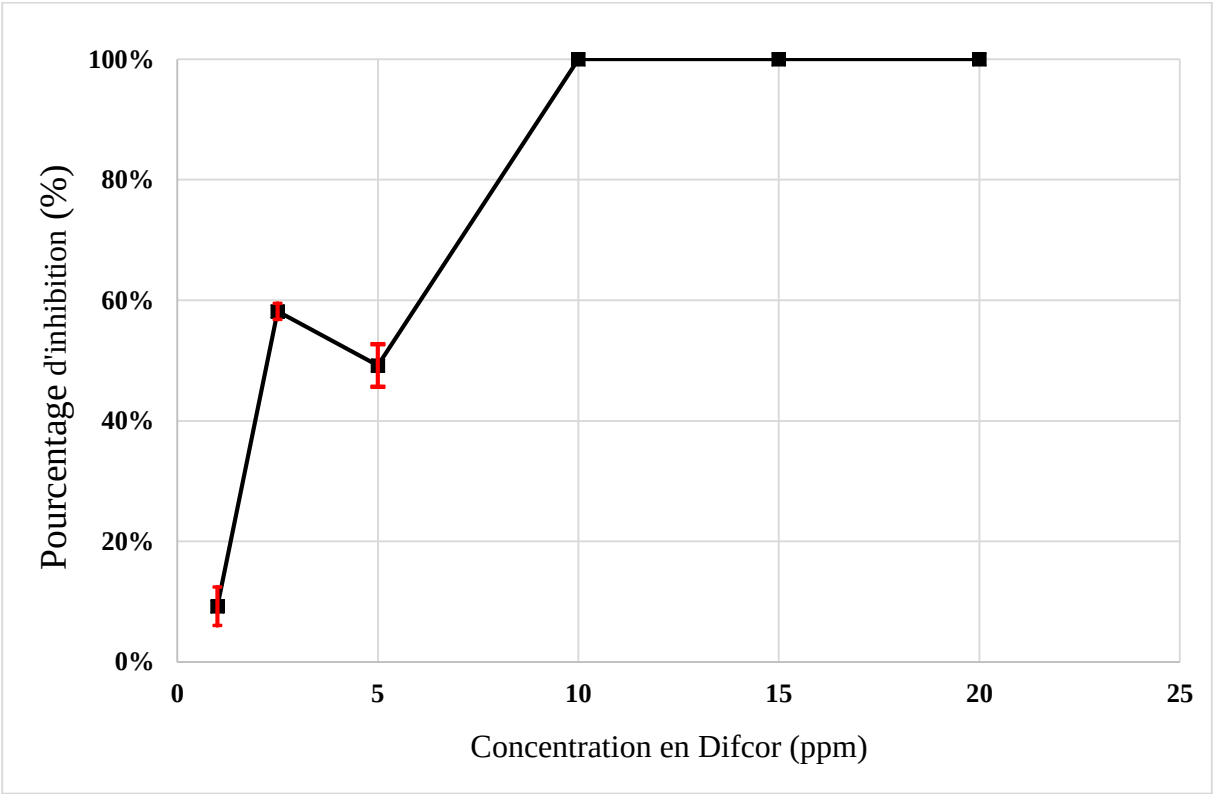
Annexes

Annexe 1 : Schéma du test sur tapis de moisissures

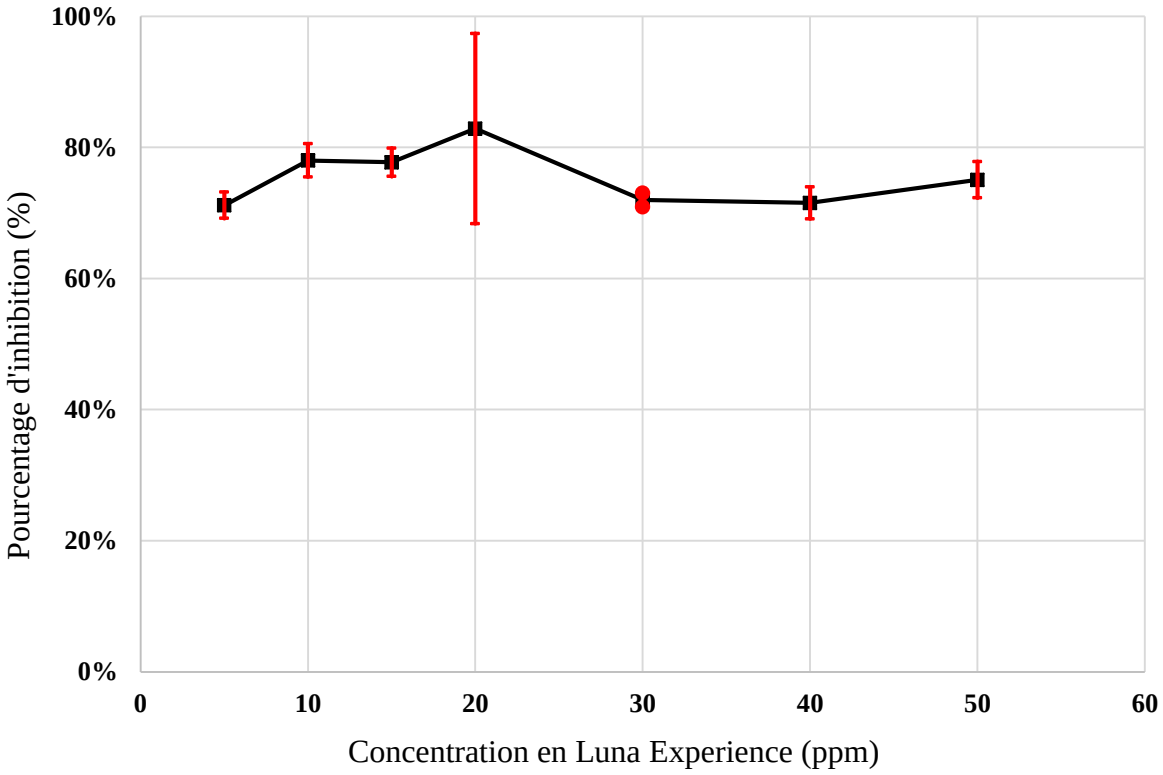


Annexe 2 : Graphiques des pourcentages d'inhibition des produits testés en fonction de leur concentration au jour 6

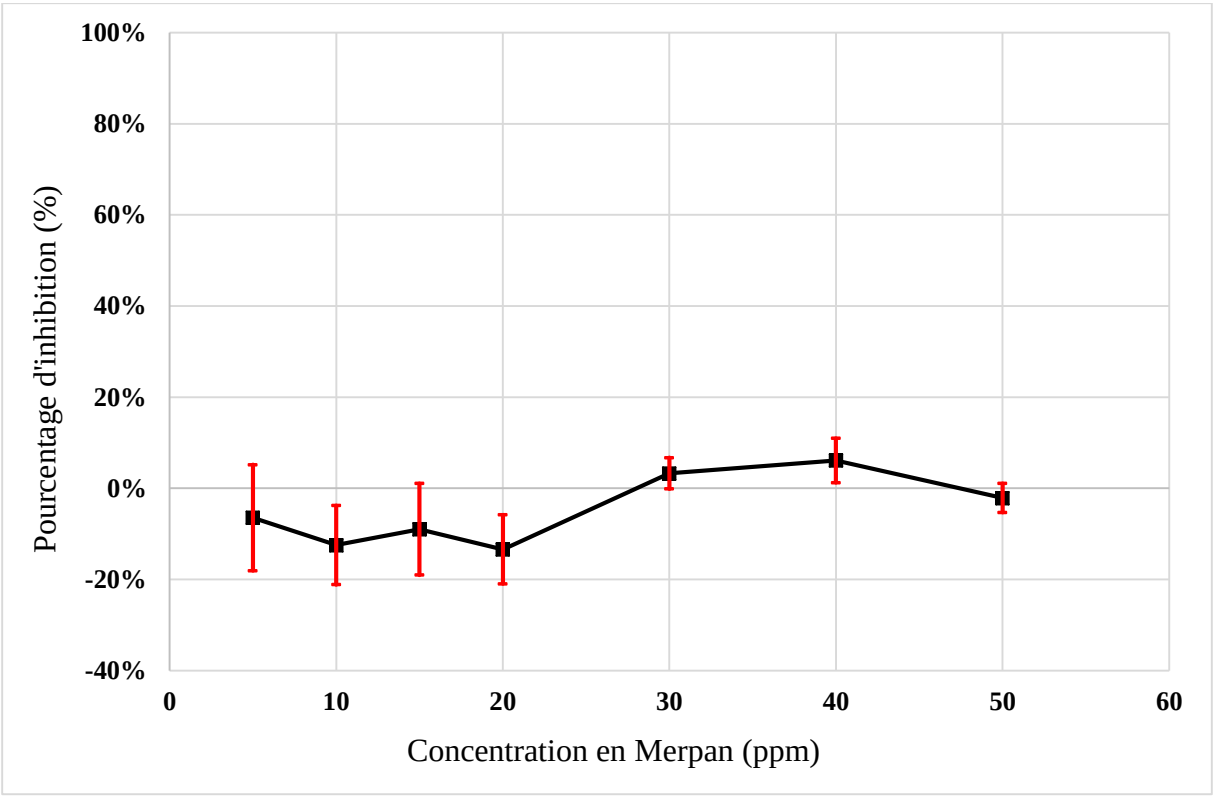
- *Difcor*



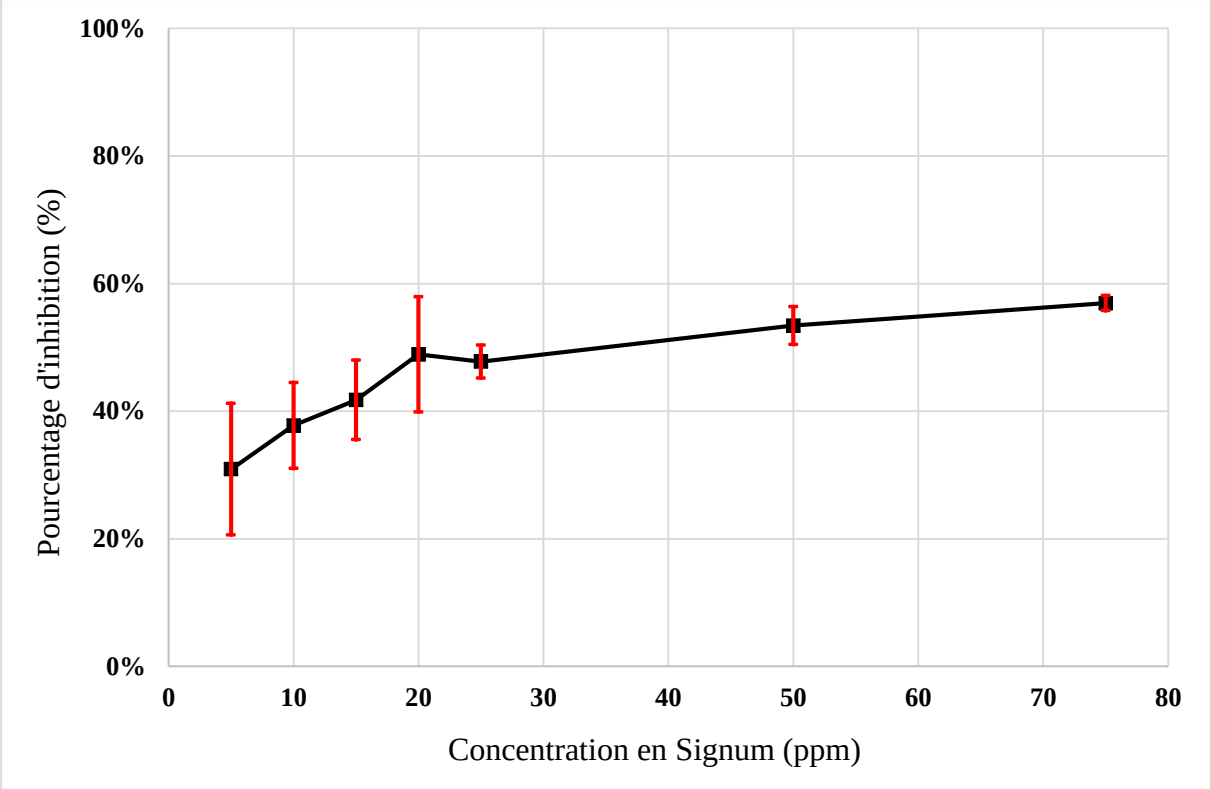
- *Luna Expérience*



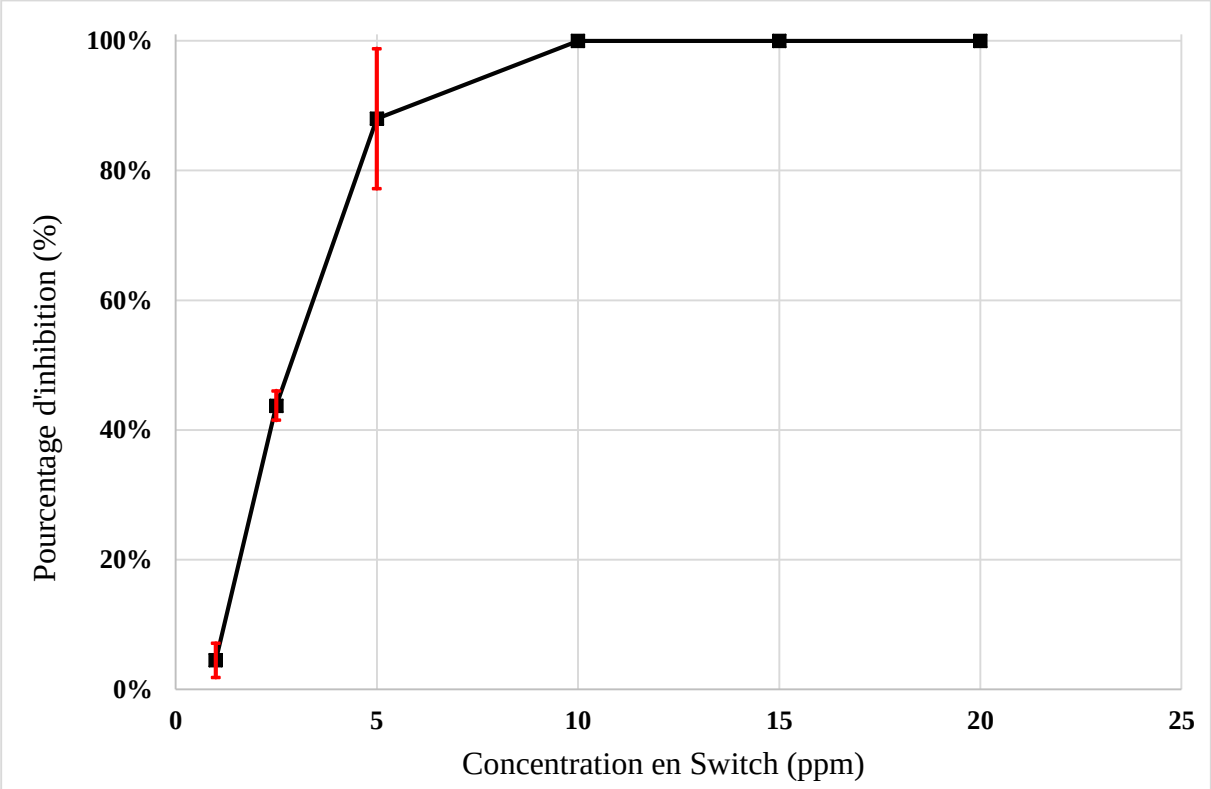
- *Merpan*



- *Signum*



- *Switch*



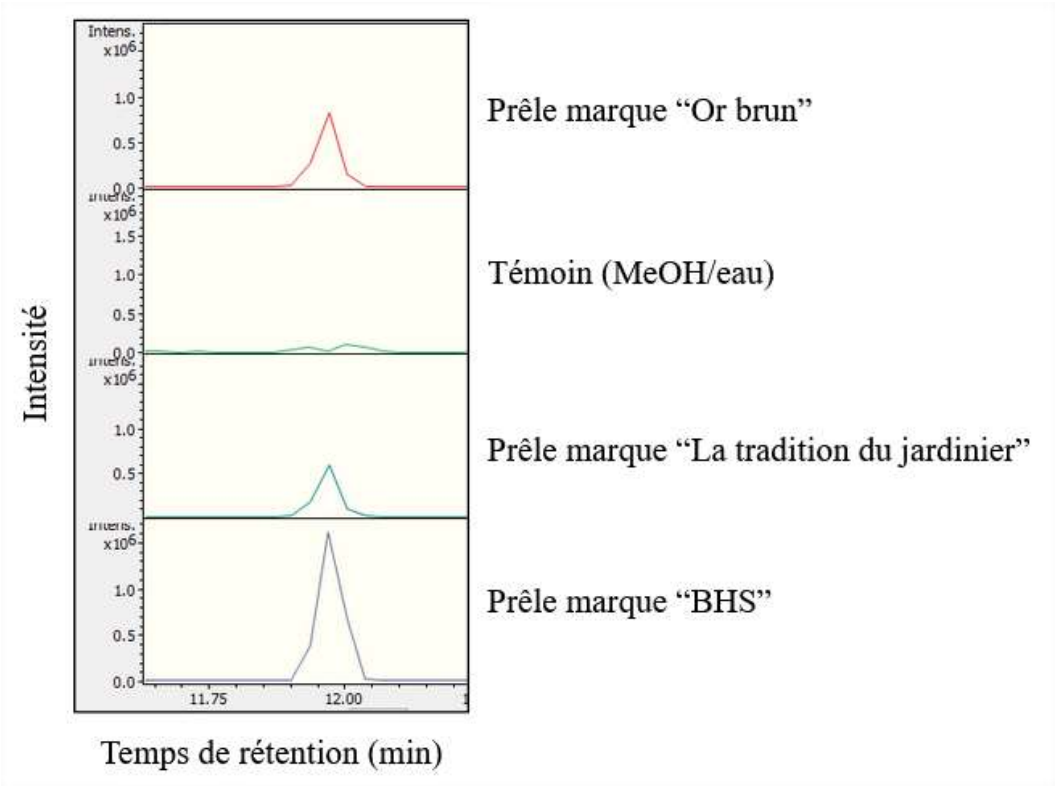
Annexe 3 : Tableau des pourcentages d'inhibition au jour 5 des purins commerciaux

	Marque	Concentration (ppm)	Inhibition (%)	Ecart-type (%)
Prêle	La tradition du jardinier	100 ppm	24,8 %	21,9 %
	Or brun	50 ppm	11,8 %	12,0 %
	BHS	80 ppm	< 0%	15,5 %
Ortie	La tradition du jardinier	100 ppm	22,8 %	7,4 %
	Naturen	25 ppm	< 0 %	11,4 %
	Botanic	40 ppm	0,4 %	12,0 %

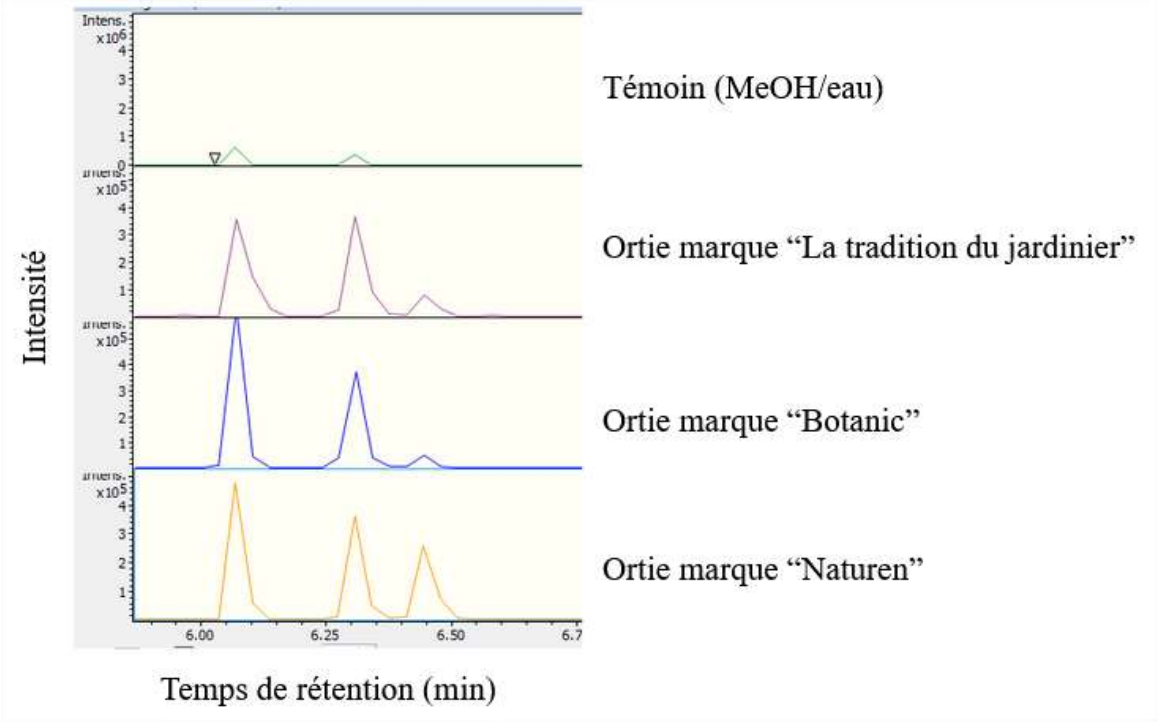
Annexe 4 : Tableau des pourcentages d'inhibition de la lécithine de soja et des décoctions d'ail et d'écorce de saule

	Jour	Concentration (ppm)	Inhibition (%)	Ecart-type (%)
Soja	6	1000 ppm	< 0 %	5,3 %
Ail	6	1360 ppm	21,4 %	21,36 %
Écorce de saule	5	3800 ppm	< 0 %	5,5 %

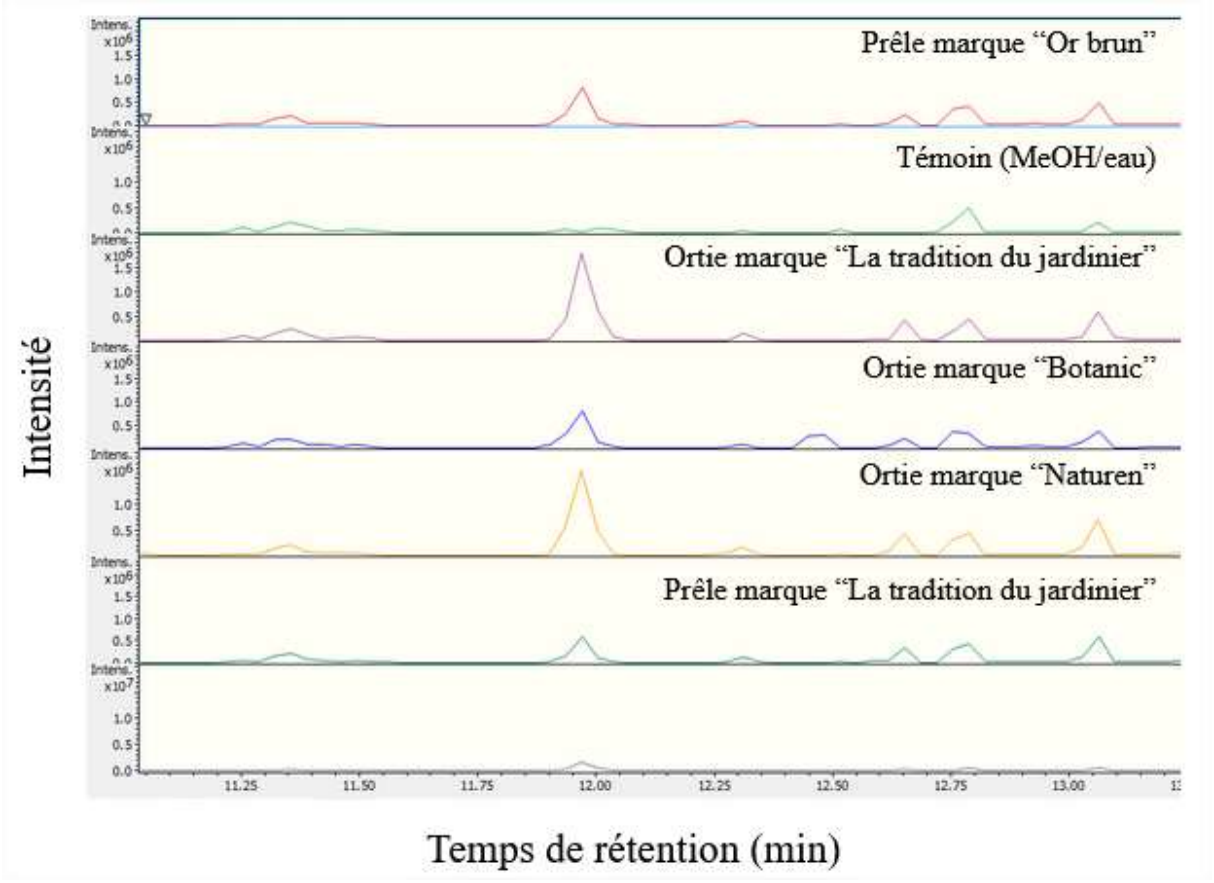
Annexe 5a : Chromatogrammes LC-HRMS-QTOF des purins de prêle à 1 mg/mL



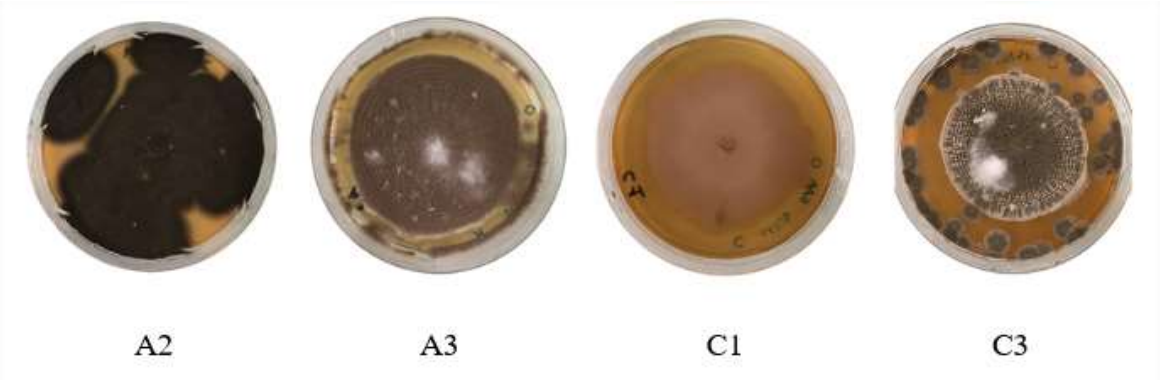
Annexe 5b : Chromatogrammes LC-HRMS-QTOF des purins d'ortie à 1 mg/mL



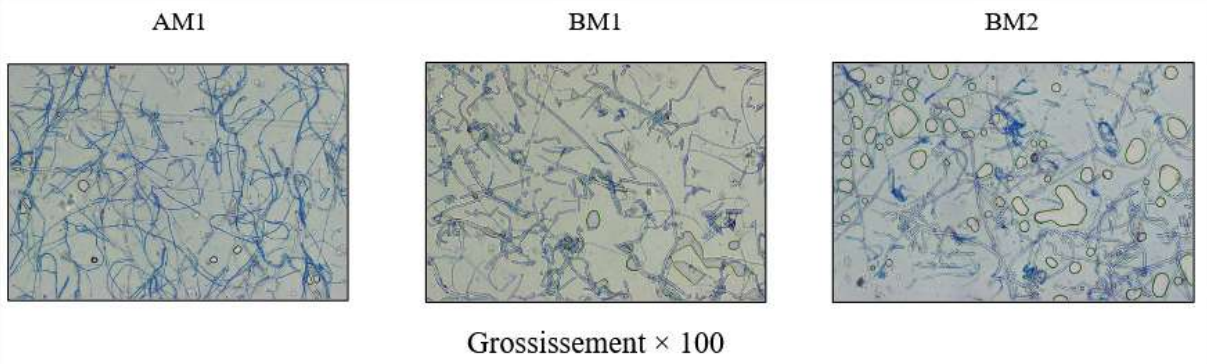
Annexe 5c : Chromatogrammes LC-HRMS-QTOF des purins commerciaux à 1 mg/mL



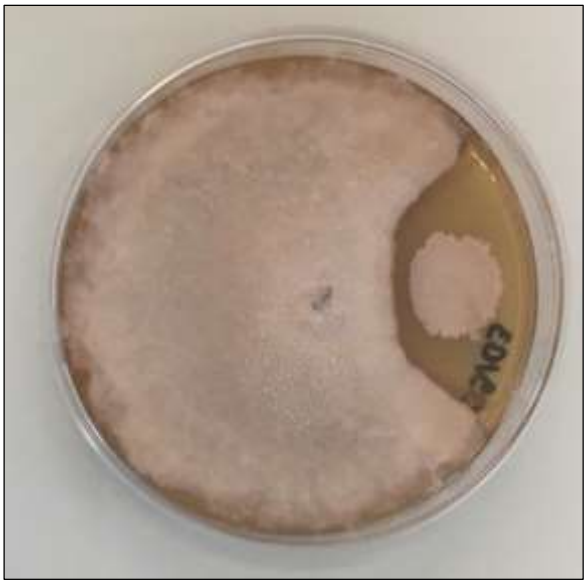
Annexe 6 : Photos de moisissures extraites et isolées des noyaux momifiés



Annexe 7 : Photos des observations microscopiques des souches AM1, BM1 et BM2

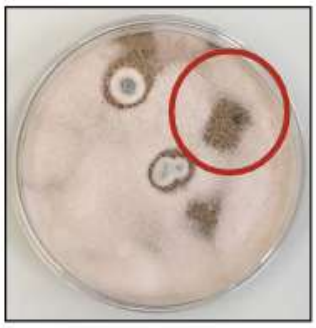


Annexe 8 : Photo de la zone d'inhibition d'un des contaminants d'intérêts prélevés (IM)

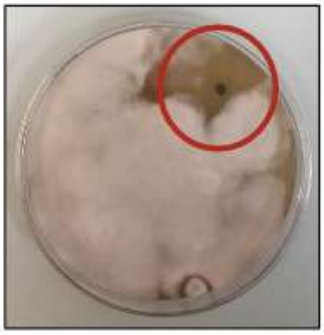


Annexe 9 : Photos du test sur tapis de moisissures du contaminant d'intérêt IM au jour 4

Absence du champignon



Présence du champignon



Résumé

La moniliose est une maladie provoquant une pourriture des fruits atteints. Elle peut être causée par 3 moisissures dont *Monilia laxa*. Dans cette étude, l'objectif a été de comparer l'efficacité de produits phytosanitaires basés sur différents modes d'actions et tester l'activité antifongique de plusieurs substances de base comme la prêle (*Equisetum arvense*) ou l'ortie (*Urtica dioica*).

Les tests effectués ont eu pour but d'expérimenter à plusieurs concentrations les produits phytosanitaires sur une souche de *Monilia laxa* de référence ainsi que sur des souches précédemment extraites et isolées de noyaux de pêches momifiés provenant des Pyrénées-Orientales (66). Ainsi, pour comparer l'efficacité des fongicides étudiés contre la moniliose, il a été calculé les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en produits phytosanitaires testées.

Structure d'accueil

Criobe Perpignan France

Campus UPVD Perpignan France (Bât R et T)

58, avenue Paul Alduy 66100 PERPIGNAN

Tel : 04 30 19 23 24