



HAL
open science

**Tavelure du pommier : étude comparative d'extraits
végétaux pour réduire l'utilisation des produits
phytosanitaires dans la lutte contre *Venturia inaequalis*
(Cooke) Winter**

Charlotte Bodart

► **To cite this version:**

Charlotte Bodart. Tavelure du pommier : étude comparative d'extraits végétaux pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires dans la lutte contre *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-01887833

HAL Id: dumas-01887833

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01887833>

Submitted on 4 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS
OUEST

- CFR Angers
 CFR Rennes



LA MORINIÈRE



Année universitaire : 2017-2018

Spécialité:

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

PPE-H

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
 de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
 d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Tavelure du pommier : étude comparative d'extraits végétaux pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires dans la lutte contre *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter.

Par : Charlotte BODART



Soutenu à Angers le 7 septembre 2018

Devant le jury composé de :

Président : Bruno JALOUX

Maître de stage : Anne DUVAL-CHABOUSSOU

Enseignant référent : Pascale GUILLERMIN

Autres membres du jury

François MAIREL, INDENA

Patrice MARCHAND, ITAB

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation



Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du maître de stage⁽²⁾ :

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur⁽³⁾ **BODART Charlotte** autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur :

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord Anne DUVAL-CHABOUSSOU, mon attentionnée maîtresse de stage tout au long des six mois qui ont marqué la fin de mon parcours scolaire, ainsi qu'à Patrice MARCHAND qui m'a recommandée à elle pour mener cette étude.

Je remercie du fond du cœur mes collègues et colocataires stagiaires qui, au-delà d'avoir partagé et fait partie intégrante de mon expérience à la Morinière, ont été d'un soutien sans faille. Toujours présents aux « notations tavelure » et prêts, malgré leurs propres contraintes, à me venir en aide quant à différents sujets de réflexion, je pense particulièrement à Marjolaine, Simon, et Mégane, que je remercie encore sincèrement pour leur patience, leur disponibilité et leur joyeuse compagnie.

Je pense également à Anthony LEBLOIS qui a systématiquement effectué avec moi le suivi hebdomadaire des témoins et les « notations tavelure » de l'essai au verger. En charge des traitements tout au long de la saison, avec Sevan que je remercie lui aussi, son implication a été indispensable au bon déroulement de l'expérimentation.

Je remercie Matteo BERGAMINI, chef de culture de la Morinière, qui à travers ses connaissances et sa compréhension du verger et de la gestion de la tavelure, a toujours été disposé à apporter des réponses à mes interrogations.

J'adresse un grand merci à Claude COUREAU, ingénieure CTIFL et responsable technique de la station, pour ses conseils précieux et avisés, et qui, soucieuse du déroulement de mon stage, a su se rendre disponible pour m'aider à des moments clefs.

La réalisation de cette étude n'aurait pu être sans l'implication de plusieurs personnes et organismes extérieurs à la station de la Morinière. Par là, je souhaite remercier Denis BELLENOT de l'ITEPMAI pour m'avoir éclairée et apporté des connaissances relatives à la chimie des plantes, ainsi que Marie-Noëlle BRISSET, Matthieu GAUCHER et Floriane BART de l'INRA d'Angers qui ont pris le temps de tester la capacité anti germinative de mes extraits végétaux à l'occasion de leurs propres études. Je pense également aux membres actifs du groupe de discussion « Arbo Bio Info », Jean-Luc PETIT, Benoît PIRON, Claude-Eric PARVEAUD, François MAIREL et Pierre MASSON, qui ont nourri l'échange provoqué quant à l'utilisation d'extraits végétaux contre la tavelure du pommier, sur le groupe de discussion « Arbo Bio Info ».

Mes remerciements vont bien entendu à François MAIREL ingénieur en extraits végétaux et directeur d'INDENA à Tours, qui a très gracieusement et très généreusement réalisé, avec ses équipes, plusieurs analyses en vue de caractériser chimiquement un certain nombre d'extraits. Je le remercie plus particulièrement pour sa disponibilité, sa réactivité et, pour le grand intérêt et l'énergie qu'il a accordés à mon étude.

Je remercie évidemment, Pascale GUILLERMIN, qui a toujours montré beaucoup d'implication et de sérieux dans son rôle d'enseignante et de tutrice, plus tôt dans ma scolarité, et à l'occasion de ces six mois de stage au long desquels elle m'a suivie, soucieuse de leur bon déroulement et de la qualité de mon travail.

Enfin, je remercie mes parents qui m'ont non seulement donné la chance de poursuivre mes études mais qui m'ont également offert l'enfance au cours de laquelle j'ai pu développer sans entrave mon goût pour les plantes, les insectes qui les mangent, et les champignons qui les parasitent.

Ce mémoire est dédié à Nicolas DURAND, qui a largement contribué à mon choix pour l'école d'ingénieur en horticulture qui m'a formée et tant apporté.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
TABLE DES MATIERES	III
GLOSSAIRE	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	VIX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE ANNEXES	XV
AVANT-PROPOS	XVII
INTRODUCTION	
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
A. Les extraits végétaux à utilité phytosanitaire	4
1. Extraits végétaux et protection des plantes : présentation, avantages et limites	4
a. Les extraits végétaux à utilité phytosanitaire d'hier à aujourd'hui	4
b. Définition et délimitation dans le cadre de l'étude du terme « extraits végétaux » ..	4
c. Avantages et limites des extraits végétaux	5
2. Les métabolites secondaires au service de la défense des plantes	6
a. Introduction aux métabolites secondaires : des composés phytochimiques variés ..	6
b. Modes d'action des métabolites secondaires	7
B. Extraits végétaux et lutte contre <i>V. inaequalis</i> : état des connaissances	8
1. Des études de natures diverses et variées	9
a. Une diversité de plantes et de modes d'extraction	9
b. Une distribution inégale des études menées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	9
c. Des connaissances issues de recherches scientifiques et de pratiques et savoirs	
empiriques	9
2. Extraits, plantes, et molécules d'intérêt dans la lutte contre la tavelure du pommier	10
a. Les plantes à saponosides	10
b. Autres extraits végétaux d'intérêt	10
II – ETUDE DES EXTRAITS <i>in vivo</i> SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA TAVELURE DU POMMIER AU VERGER ...	11
A. Objectifs de travail et hypothèses	11
B. Matériel et méthodes	11
1. Expérimentation au verger	12
a. Conditions expérimentales (matériel végétal et plan d'expérimentation)	12
a-1. Conditions d'essai (matériel végétal, parcelle)	12
a-2. Dispositif expérimental	12
b. Exécution des traitements	12
b-1. Choix et préparation des traitements	12
b-2. Modalités d'application	14
c. Suivi : notations, comptages et mesures	15
c-1. Epoque et fréquence	15
c-2. Méthode	15
d. Analyse des données	15
2. Caractérisation des extraits employés au verger	16
a. Composition des plantes	16
b. Identification de composés théoriquement présents dans les extraits, définition de	
traceurs	17
c. Analyses HPLC des extraits	17

C. Résultats	17
1. Expérimentation au verger	17
a. Etude statistique préliminaire des variables	17
b. Résultats de l'analyse des données	18
b-1. Résultats du premier comptage sur feuilles	18
b-2. Résultats du second comptage sur feuilles	18
b-3. Résultats sur fruits	19
2. Caractérisation des extraits employés au verger	19
a. Composition des plantes	19
b. Identification de composés théoriquement présents dans les extraits, définition de traceurs	19
c. Analyses HPLC des extraits	20
III – ETUDE DES EXTRAITS <i>in vitro</i> SUR LA GERMINATION DES CONIDIES	21
A. Objectifs de travail et hypothèses	21
B. Matériel et méthodes	21
1. Tests de germination en laboratoire	21
a. Choix et préparation des extraits végétaux	21
b. Réalisation des tests de germination	22
c. Suivi : notations, comptages et mesures	23
d. Analyse des données	24
2. Caractérisation des extraits employés au laboratoire	24
a. Identification de composés théoriquement présents dans les infusions et le macérât de peuplier	24
b. Composition des extraits secs d'INDENA	24
C. Résultats	25
1. Tests de germination en laboratoire	25
a. Etude statistique préliminaire des variables	25
b. Résultats de l'analyse des données	25
2. Caractérisation des extraits employés au laboratoire	26
a. Composition théorique des différentes infusions et du macérât alcoolique de peuplier	26
b. Composition des extraits secs d'INDENA	26
IV – DISCUSSION	27
A. Retour sur l'expérimentation au verger	27
1. Interprétation des résultats	27
a. Incohérences dans les résultats inhérents au traitement «Référence bio»	27
b. Observation de l'efficacité significative d'un extrait	27
2. Analyse critique de la méthode	28
a. Expérimentation au verger	28
b. Caractérisation des extraits	29
B. Retour sur l'expérimentation au laboratoire	29
1. Interprétation des résultats avec les extraits testés au verger	29
2. Interprétation des résultats avec les autres extraits	29
a. Tests de germination	29
b. Caractérisation des extraits	29
3. Analyse critique de la méthode	30
a. Tests de germination	30
b. Caractérisation des extraits	31
C. Perspectives – propositions pour une nouvelle étude	31
1. Travaux bibliographiques- choix des plantes et de leur mode d'extraction	31
2. Fabrication des extraits testés – qualité et faisabilité	32

3. Agencement des expérimentations – diversité d’acteurs et de compétences	32
a. Détermination du mode d’action et de doses efficaces <i>in vitro</i>	33
b. Evaluation de l’efficacité des extraits et des doses retenus <i>in vivo</i>	33
CONCLUSION	34
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
SITOGRAFIE	
ANNEXES	I
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ANNEXES	VII

GLOSSAIRE

Agreste : site du Service de la Statistique et de la Prospective du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation

Agriculture Biologique : « système de production qui maintient et améliore la santé des sols, des écosystèmes et des personnes. Elle s'appuie sur des processus écologiques, la biodiversité et des cycles adaptés aux conditions locales, plutôt que sur l'utilisation d'intrants ayant des effets adverses. L'agriculture biologique allie tradition, innovation et science au bénéfice de l'environnement commun et promeut des relations justes et une bonne qualité de vie pour tous ceux qui y sont impliqués » (IFOAM, s.d.).

Analyse HPLC : technique employée dans les laboratoires d'analyses chimiques consistant à identifier, séparer et doser des composés chimiques dans un mélange (HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression, s.d.).

Ascospore : spore sexuée caractéristique des champignons ascomycètes.

Conidie : spore assurant la multiplication asexuée des champignons.

Décoction : méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'une préparation, généralement végétale, portée à ébullition et maintenue à température pendant une durée variable.

Homoscédasticité : en statistiques, homogénéité de la variance de l'erreur dans l'ensemble formé par les valeurs observées.

Huile essentielle : «Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » - Définition de la Pharmacopée Européenne citée dans la fiche « Les huiles essentielles dans la protection des cultures » de l'ITEPMAI (Furet et Bellenot, 2016).

Infusion : méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'une préparation, généralement végétale, portée à la température souhaitée sans y être maintenue.

Macération : méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'une préparation, généralement végétale, dans un solvant à froid.

Métabolites secondaires : les métabolites secondaires des plantes sont des composés phytochimiques biologiquement actifs. Ils interviennent dans la survie et l'adaptation écologique des plantes qui les ont développés et sélectionnés au cours du temps pour se défendre des ravageurs, des pathogènes, et des plantes concurrentes. Ils assurent des fonctions non essentielles, leur absence n'est pas létale pour l'organisme, contrairement aux métabolites primaires. (Wink, 2006 ; Martínez 2012)

Pharmacognosie : étymologiquement la connaissance (*gnosis*) des poisons (*pharmacon*), il s'agit de «l'étude des matières premières et des substance à visée thérapeutique d'origine biologique, c'est à dire obtenues à partir des végétaux, des animaux ou par fermentation à partir de micro-organismes» (Bruneton, 1999).

Phytoalexines : « les phytoalexines sont des molécules de faible poids moléculaire. Leur synthèse est induite de novo en réponse à un stress biotique ou abiotique. Produites extemporanément par la plante, elles s'accumulent au voisinage des sites d'infection et possèdent un pouvoir inhibiteur ou toxique vis-à-vis des micro-organismes ou des cellules végétales ou animales. Elles jouent un rôle majeur dans la résistance aux pathogènes [...] » (Pajot et Regnault-Roger, 2008).

Phytochimie : branche de la chimie qui étudie les substances végétales, leur structure, leur distribution dans la plante, leurs modifications et les processus de transformation qui se produisent au cours de la vie de la plante. Elle s'intéresse également aux méthodes d'analyse de ces substances.

Pousse de bourse : rameau qui se développe latéralement sur une bourse (base de l'inflorescence partiellement porteuse de fruit).

Protéine PR (Pathogenesis Related) : protéines ubiquistes dans le règne végétal, engendrées de façon locale et systémique, elles s'accumulent en réponse à différents stress notamment à la suite d'attaques par des pathogènes (Pajot et Regnault-Roger, 2008). Certaines attaquent les structures vitales ou inhibent le pouvoir pathogène des micro-organismes, tandis que d'autres possèdent des fonctions encore inconnues (Lateur, 2002).

Résistance spécifique : « dépend d'une reconnaissance spécifique entre un gène majeur de résistance chez la plante et un gène d'avirulence correspondant chez l'agent pathogène. L'infection par un agent pathogène induit l'activation de mécanismes de défense de la plante. » (Lateur, 2002)

Résistance induite : se traduit par une augmentation de la capacité d'une plante à se défendre face à un large spectre d'agents pathogènes, elle se manifeste par l'activation des mécanismes de défense naturelle présents dans la plante mais à l'état latent. Ce type de résistance peut être induit par une large diversité d'agents, pouvant être de nature infectieuse ou non. (Lateur, 2002)

Rosette : ensemble des feuilles préformées dans le bourgeon, elles encerclent la base de la pousse de l'année.

Spore : organe de dissémination des champignons pouvant donner naissance à un nouveau mycélium.

LISTE DES ABREVIATIONS

ANOVA : ANalysis Of Variance (analyse de la variance)

BSC : Bouillie Sulfo-Calcique

CTIFL : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

Cu : Cuivre

HE : Huile Essentielle

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression (ou Haute Performance)

IFT : Indicateur de Fréquence de Traitement

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ITEPMAI : Institut Technique Interprofessionnel des Plantes à parfum, Médicinales et Aromatiques

MSs : Métabolites Secondaires

NS : Non Significatif

OEPP : Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PR : Pathogenesis Related (protéine PR)

qPFD : Puce à Faible Densité Quantitative

S : Soufre

SDP : Stimulateur de Défense des Plantes

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Interaction moléculaire avec leur cible de quelques métabolites secondaires impliqués dans la défense des plantes aux agents pathogènes, d'après Michael Wink (Wink, 2006)

Tableau 2.a : Inventaire des expérimentations relatives à l'utilisation d'extraits végétaux pour la maîtrise de la tavelure du pommier - littérature scientifique internationale

Tableau 2.b : Inventaire des expérimentations relatives à l'utilisation d'extraits végétaux pour la maîtrise de la tavelure du pommier - savoirs populaires

Tableau 3 : Modalités témoin et produits de référence

Tableau 4 : Modalités extraits végétaux

Tableau 5 : Doses et volume de traitement

Tableau 6 : Dates des traitements durant la période couverte par l'essai

Tableau 7 : Résultats de l'analyse des données - Expérimentation au verger

Tableau 8 : Liste non-exhaustive des composés constituant théoriquement les extraits - Définition de traceurs

Tableau 9 : Résultats du dosage des traceurs

Tableau 10 : Séries de tests de germination

Tableau 11 : Extraits végétaux testés par chaque série

Tableau 12 : Produits testés pour chaque série de test

Tableau 13 : Résultats de l'analyse des données - Expérimentation au laboratoire

Tableau 14 : Liste non-exhaustive des composés constituant théoriquement les extraits testés au laboratoire

Tableau 15 : Traceurs dosés dans extraits secs fournis par INDENA

Tableau 16 : Tableau de comparaison de la composition des extraits en quelques métabolites secondaires récurrentes et/ou connues pour leur rôle dans la défense des plantes contre les attaques fongiques

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nombre moyen de traitements phytosanitaires dans les vergers de pommiers selon cinq bassins de production en 2011

Figure 2 : Nombre moyen de traitements fongicides sur pommiers en 2011

Figure 3 : Cycle de *Venturia inaequalis*

Figure 4 : Symptômes de tavelure sur feuille face supérieure

Figure 5 : Symptômes de tavelure sur pomme

Figure 6 : Logo Plan Ecophyto

Figure 7 : Logo «Zéro Résidu de pesticides»

Figure 8 : Changements métaboliques associés à la résistance des plantes

Figure 9 : Principaux agents aux propriétés d'activation de la résistance induite des plantes

Figure 10 : Plan de l'expérimentation au verger menée à la Morinière

Figure 11 : Préparation d'une décoction de racine d'ortie et d'une décoction de prêle (gauche à droite)

Figure 12 : Plantes séchées pour l'infusion «trois plantes» : feuilles de sureau, clous de girofle, serpolet (gauche à droite)

Figure 13 : Plantes séchées conditionnées dans des sachets en papier

Figure 14 : Fabrication de l'infusion «trois plantes»

Figure 15 : Atomiseur automoteur Yonisos

Figure 16 : Résultats - Histogrammes donnant les différents taux d'organes tavelés selon les modalités testées pour les deux comptages

Figure 16.a : Premier comptage - Taux de feuilles de rosette et de rosettes tavelées en fonction du traitement

Figure 16.b : Premier comptage sur pousses de bourse - Taux de feuilles et de pousses de bourse tavelées en fonction du traitement

Figure 16.c : Premier comptage sur feuilles - Taux de feuilles et de pousses/rosettes tavelées au total en fonction du traitement

Figure 16.d : Second comptage sur rosettes - Taux de feuilles de rosette et de rosettes tavelées en fonction du traitement

Figure 16.e : Second comptage sur pousses de bourse - Taux de feuilles et de pousses de bourse tavelées en fonction du traitement

Figure 16.f : Second comptage sur feuilles - Taux de feuilles et de pousses/rosettes tavelées au total en fonction du traitement

Figure 16.g : Comptage sur fruits - Fréquence d'infestation - Taux de fruits tavelés en fonction du traitement

Figure 16.h : Comptage sur fruits - Intensité d'infestation et répartition (%) des fruits par niveau d'infestation en fonction du traitement

Figure 17 : Récolte de feuilles tavelées dans le verger piège

Figure 18 : Préparation du mélange cuivre et soufre de la «Référence bio»

Figure 19 : Extraits végétaux prêts à l'emploi

Figure 20 : Préparation des unités expérimentales

Figure 21 : Découpe des taches de tavelure pour préparer la suspension de spores

Figure 22 : Conidies de *V. inaequalis* non germées (x200)

Figure 23 : Conidies de *V. inaequalis* germées (gauche) et non germées à (droite) (x200)

Figure 24 : Résultats tests de germination - Histogramme de série

Figure 24.a : Résultats tests de germination série 1

Figure 24.b : Résultats tests de germination série 2

Figure 24.c : Résultats tests de germination série 3

Figure 24.d : Résultats tests de germination série 4

Figure 25 : Conidies de *V. inaequalis* agglutinées (x200)

Figure 26 : Spore d'un champignon autre que *V. inaequalis* (x200)

Figure 27 : Extraits secs d'INDENA : écorces de chêne, thé vert, pépins de raisin (gauche à droite)

Figure 28 : Proposition d'une démarche générale à adopter en perspective d'une nouvelle étude

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Matériel et méthodes pour l'analyse de croissance fongique par néphélométrie (INRA d'Angers)	III
Annexe 2 : Liste non exhaustive des composés identifiés dans la littérature pour les plantes utilisées au verger	IV
Annexe 3.a : Résultats de l'analyse HPLC décoction de prêle - Chromatogramme	VI
Annexe 3.b : Résultats de l'analyse HPLC décoction de racines d'ortie - Chromatogramme	VI
Annexe 3.c : Résultats de l'analyse HPLC infusion «trois plantes» - Chromatogramme	VII

AVANT-PROPOS

Le mémoire qui suit a été réalisé dans le cadre d'un stage de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Agrocampus Ouest Centre d'Angers en spécialisation «Protection des Plantes et Environnement en Horticulture».

Encadré par une ingénieure du CTIFL, Anne DUVAL-CHABOUSSOU, le stage a été effectué à la station d'expérimentations fruitières de La Morinière. Celle-ci, stratégiquement implantée sur la commune de Saint-Epain en Indre et Loire, est à l'interface des grands bassins de production pomicole du quart Nord Ouest de la France. Le site est principalement constitué d'un verger conventionnel divisé en vingt-huit hectares de pommiers, cinq hectares de poiriers et quelques trois cent mètre carrés de cassissiers, auxquels s'ajoutent quelques parcelles menées en agriculture biologique, qui, suite à la dernière conversion en date, s'approchent timidement des trois hectares.

Les équipes de la Morinière travaillent ainsi à construire des références techniques en verger, principalement de pommiers, à destination des producteurs et des techniciens en vue de les aider à répondre aux attentes des consommateurs dans une démarche de respect de l'environnement, et ce, tout en maintenant leur compétitivité. Plusieurs thématiques, allant de la maîtrise de la charge aux problématiques de conservation, en passant par la maîtrise des bioagresseurs, sont approfondies au sein de la station. Celle traitée à l'occasion de ce mémoire s'inscrit dans le contexte actuel de modification des pratiques agricoles visant à identifier, évaluer et appliquer des solutions durables de protection des cultures. Elle concourt plus précisément à l'objectif de réduction des fongicides cupriques et de synthèse employés en agrobiologie et en conventionnel en vue de lutter contre l'agent pathogène responsable de la tavelure du pommier, *Venturia inaequalis*. Les effets de différents extraits végétaux sur le développement de la tavelure primaire au verger, et sur la germination des spores du champignon *in vitro*, ont ainsi été testés, faisant l'objet d'une étude encore sans précédent à La Morinière.

INTRODUCTION

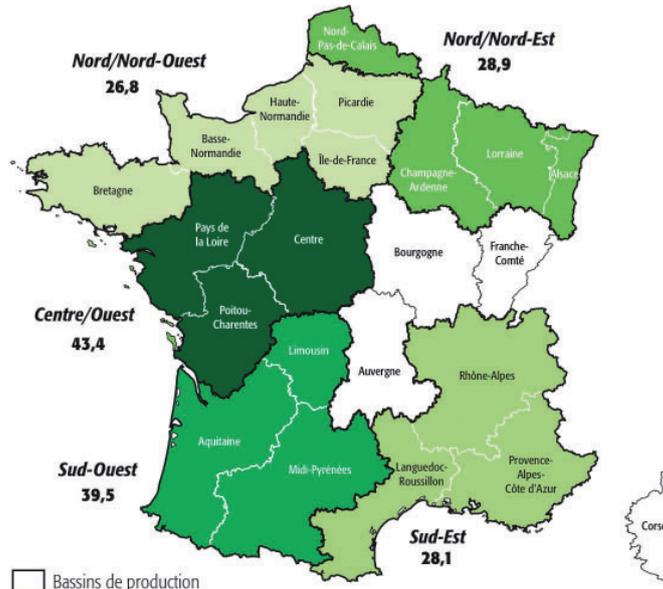
L'Union Européenne est à l'origine de 12 à 13 millions de tonnes, principalement issues des vergers polonais, italiens et français, des quelques 60 à 70 millions de tonnes de pommes à couteau produites à la surface du globe chaque année (Guiavarch *et al*, 2012 ; Guiavarch, 2015 ; Guiavarch, 2017). En France, en 2016, approximativement 37 000 ha (Bernadette et Bouchard-Aerts, 2017) dont 3340 certifiés en agriculture biologique (Agence BIO, 2018) étaient dédiés à cette filière aux 1,5 à 1,7 millions de tonnes de fruits par an (Guiavarch *et al*, 2012 ; Guiavarch, 2015 ; Guiavarch, 2017; FranceAgriMer, 2018). La pomme à couteau est à la fois le fruit dont les volumes produits sont les plus importants sur le territoire français (53% de la production fruitière) loin devant la pêche-nectarine, mais également le plus consommé par ses habitants qui le préfèrent à la banane et à la clémentine. La filière, particulièrement organisée et structurée (développement de variétés club et de marques, présence sur les marchés, organisations de producteurs et autres opérateurs compétents), revêt ainsi une importance économique et sociale significative, notamment à l'export où elle se chiffrait, en 2016, à un montant supérieur à 535 millions d'euros (FranceAgrimer, 2018).

A la tête de l'arboriculture fruitière mondiale, la pomme à couteau n'en n'est pas moins le fruit recevant le plus de traitements à l'hectare. De manière générale, en France, l'IFT (Indice de Fréquence de Traitement) en culture de pommiers varie de 35 à 43 (Jamar, 2011). La **Figure 1** illustre le nombre moyen de traitements phytosanitaires appliqué en 2011 dans les vergers de pommiers au regard de cinq bassins de production (Agreste, 2015). Selon une enquête menée en 2012 par le Service de la Statistique et de la Prospective du Ministère de l'agriculture, les vergers de pommiers français ont reçu en moyenne 36,4 traitements phytosanitaires (suivi de 22,3 pour les pêcheurs et 12,5 pour les abricotiers) (Pujol, 2014). Ces traitements sont pour près des trois-quarts des fongicides, dont la grande majorité est tournée contre l'agent pathogène responsable de la tavelure du pommier, *Venturia inaequalis* (Pujol, 2014 ; Agreste, 2015) (**Figure 2**). Les régions, comme les Pays de la Loire, le Poitou-Charentes et la région Centre, en raison de leur contexte climatique, en sont de particulièrement gros consommateurs ; à l'inverse dans les régions méditerranéennes, au climat plus sec, la charge de traitements anti-tavelure est allégée (Pujol, 2014).

La tavelure du pommier provoquée par le champignon *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (anamorphe *Spilosea pomi*), est effectivement la maladie la plus préoccupante sur pommier. Largement répandue dans l'ensemble des régions du monde où sont produites des pommes, elle constitue un défi majeur pour les arboriculteurs (MacHardy, 1996). Le cycle de *Venturia inaequalis* (**Figure 3**) se déroule en deux phases :

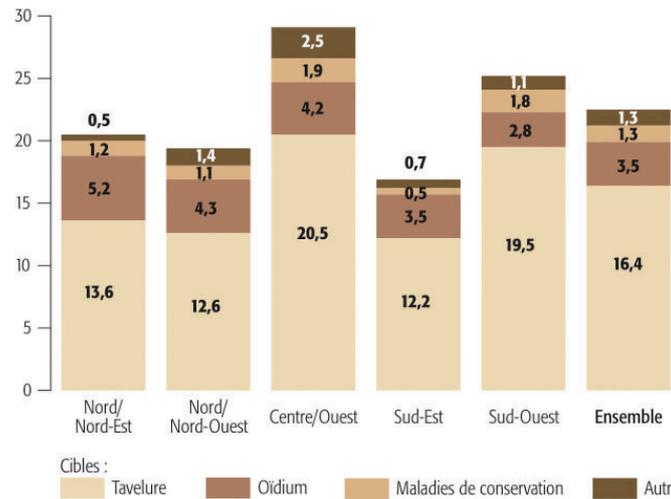
- Une phase saprophyte démarre en automne dans les feuilles tavelées en sénescence. Le mycélium du champignon alors subcuticulaire migre dans le mésophylle où se déroule la reproduction sexuée du champignon, suite à la fécondation entre deux hyphes de signe sexuel opposé. Les spores sexuées, ou ascospores, commencent leur développement à la fin de l'hiver, elles arrivent à maturité au printemps pour être projetées hors de la litière et disséminées (lorsque les conditions d'humidité et de température sont réunies), germer, et ainsi initier un premier cycle infectieux.
- La phase parasitaire peut abriter une succession de cycles infectieux à l'origine de l'inoculum secondaire. La germination et le développement des ascospores (inoculum primaire) sous la cuticule des tissus végétaux sensibles (feuilles, bourgeons), aboutit à l'émergence de spores asexuées, les conidies, en surface. Celles-ci peuvent être transportées sur de nouveaux tissus, les infecter, et s'y multiplier (inoculum secondaire). Ces cycles de reproduction végétative peuvent se perpétuer jusqu'à ce que feuilles et pommes aient chuté de l'arbre (Soufflet-Freslon, 2010).

Dès lors que le stade phénologique «gonflement des bourgeons» du pommier est dépassé (stade B du code de Baggiolini), les premières contaminations peuvent se déclarer. Leur risque d'apparition, multifactoriel, est à la fois corrélé aux conditions climatiques (pluviométrie, durée d'humectation des feuilles, température,...), à l'état du stock de spores projetables (mûres), ou encore à la vitesse de croissance de l'arbre, les jeunes organes étant particulièrement sensibles et pouvant, selon la nature du traitement (systémique ou non), ne pas être couverts (Häseli *et al*, 2005).



Note de lecture : les régions Auvergne, Bourgogne, Corse et Franche-Comté ne sont pas enquêtées.

Figure 1 : Nombre moyen de traitements phytosanitaires dans les vergers de pommiers selon cinq bassins de production en 2011
source : Agreste, 2015



Note de lecture : un traitement phytosanitaire correspond à l'application d'un produit spécifique lors d'un passage (cf « Méthodologie – définitions »).

Figure 2 : Nombre moyen de traitements fongicides sur pommiers en 2011
source : Agreste, 2015

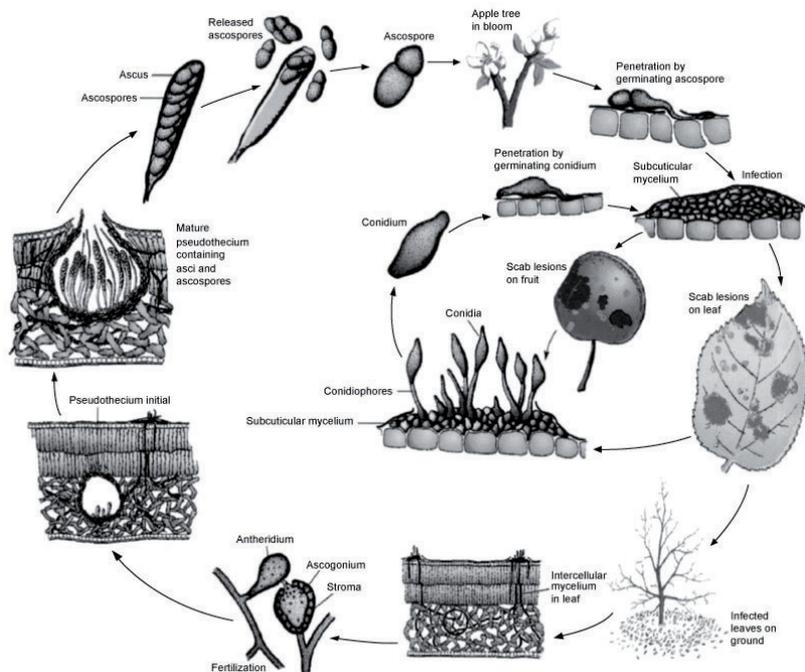


Figure 3 : Cycle de *Venturia inaequalis*
source : Agrios, 2012

Les symptômes peuvent se matérialiser sur les limbes et le pétiole des feuilles, les sépales, les fleurs, les jeunes pousses, les écailles des bourgeons et sur les fruits. Les lésions sur feuilles se produisent à la fois sur face supérieure (**Figure 4**) et sur face inférieure. Sur face supérieure, au début de l'infection des taches circulaires plus claires que les zones saines apparaissent, elles se couvrent ensuite de mycélium qui irradie du point par le lequel le champignon est entré, les lésions s'élargissent, se teintent d'un vert-olive et prennent une apparence duveteuse liée au développement des conidiophores (MacHardy, 1996). Les jeunes fruits sont particulièrement sensibles, les lésions sur ceux-ci sont larges et vont jusqu'à les déformer, voire les faire chuter. En s'approchant de la maturité, les pommes gagnent en résistance, ainsi les lésions provoquées par des contaminations tardives se développent plus lentement (MacHardy, 1996). Une infection des fruits trop rapprochée de la récolte peut être à l'origine de symptômes de tavelure dite de conservation. Le champignon complète son développement en chambre froide et les taches apparaissent à partir de janvier voire mars, alors que les pommes sont déjà stockées (Didelot *et al*, 2018).

Les pertes économiques à la fois dues au déclasserment des fruits tavelés (**Figure 5**) (invendables d'un point de vue qualitatif, notamment esthétique), ainsi qu'à la baisse de productivité du verger, liée aux chutes des pommes infectées et à l'affaiblissement des arbres (MacHardy, 1996), expliquent le déploiement de moyens mis en œuvre pour maîtriser la tavelure du pommier. Les stratégies de lutte contre *Venturia inaequalis* peuvent être distribuées en deux catégories. On distingue une stratégie offensive de réduction des ascospores dans la litière (traitement de la litière avec des produits qui limitent le développement des ascospores ou les détruisent (urée,...), ou, suppression/réduction mécanique de la litière foliaire par broyage), d'une stratégie préventive et curative qui vise à protéger les pommiers des infections par les ascospores et les conidies (fongicides, conduite culturale, résistance génique, mélanges variétaux) (Soufflet-Freslon, 2010). La majeure partie de la stratégie de lutte contre *Venturia inaequalis* repose néanmoins sur l'application de fongicides de synthèse et/ou de préparations à base de cuivre.

Pointés du doigt pour leurs effets préoccupants sur l'environnement et la santé humaine, auxquels s'ajoutent les inquiétudes liées à l'apparition de résistances, les produits phytosanitaires de synthèse sont au cœur du débat actuel de réduction des intrants. Dans cette optique, le plan national Ecophyto (**Figure 6**) piloté et lancé par l'Etat en 2008 mobilise les acteurs du monde agricole, à travers de nombreuses actions, pour tenter de « diminuer le recours aux produits phytosanitaires, tout en continuant à assurer un niveau de production élevé tant en quantité qu'en qualité » (Le plan Écophyto, qu'est-ce que c'est ?, s.d.). D'autre part, la problématique des résidus retrouvés dans les produits anime de nombreux débats, entre autres alimentés par les associations de consommateurs, mais également par plusieurs rapports annuels de l'Europe. Ceux-ci statuent qu'environ 40% de la nourriture vendue sur le marché européen contient des résidus détectables, dont environ 4% dépassent les limites autorisées. Si bien que l'Union Européenne ne serait en capacité ni d'évaluer ni de maîtriser le risque représenté par l'exposition aux différentes substances chimiques retrouvées dans l'alimentation, plus connue sous le nom d' « effet cocktail » (Jamar, 2011). Les limites de résidus imposées par les acheteurs, notamment par les grands groupes, sont de plus en plus strictes et contraignent sérieusement l'emploi des fongicides de synthèse. . A cela s'ajoute la récente création, par le collectif « Nouveaux Champs » (fédérant de nombreux groupes tel « Les paysans de Rougeline », « Bluewhale »,...), de la marque « Zéro Résidu de Pesticides » (**Figure 7**) qui se veut une « troisième voie entre l'agriculture conventionnelle et l'agriculture biologique » (Le Collectif Nouveaux Champs, pour le « Zéro Résidu de pesticides », s.d).

Outre les fongicides de synthèse utilisés en agriculture conventionnelle, les traitements cupriques largement employés en agriculture biologique sont également remis en cause. Le cuivre a effectivement tendance à s'accumuler dans les horizons de surface des sols (Merrington, 2001), et à augmenter la mortalité des populations de vers de terre (Jamar, 2011). Des études menées depuis plus de vingt ans au Japon en verger de pommier ont montré que l'accumulation de cuivre avait des effets dommageables sur la biomasse et les activités microbiennes, impactant entre autres la dégradation de la matière organique, impliquée dans le cycle de l'azote et la nutrition des arbres (Aoyama et Nagumo, 1996 ; Aoyama et Nagumo, 1997 ; Aoyama et Tanaka, 2013). Les doses de cuivre autorisées en arboriculture sont de plus



Figure 4 : Symptômes de tavelure sur
feuille face supérieure
source : Charlotte BODART, La
Morinière, 11/06/2018



Figure 5 : Symptômes de tavelure sur
pomme
source : American Phytopathological
Society, s.d.



Figure 6 : Logo Plan Ecophyto
source : Le plan Écophyto, qu'est-ce que c'est ?, s.d



Figure 7 : Logo «Zéro Résidu de pesticides»
source : Le Collectif Nouveaux Champs, pour le «
Zéro Résidu de pesticides », s.d

amenées à passer de six à quatre kilogrammes de cuivre métal par an et par hectare, alors qu'en 2002 son utilisation n'était pas réglementée. Certains pays européens limitent déjà le cuivre (1,5kg/ha/an en Suisse) (Häseli *et al*, 2005), voire l'interdisent complètement comme au Danemark ou aux Pays-Bas (Jamar, 2011). Les producteurs ont ainsi tendance à compenser le cuivre avec d'importantes quantités de soufre avec leurs propres inconvénients (Köhl, 2007).

L'ensemble de ces facteurs va progressivement forcer les producteurs en agriculture biologique et conventionnelle à effectuer des changements fondamentaux dans leur rapport aux fongicides synthétiques et cupriques pour lutter contre la tavelure du pommier. Pour y parvenir, plusieurs leviers d'action existent, l'un d'entre eux réside dans le développement de produits alternatifs. Différentes substances naturelles ont ainsi été testées en vue d'être utilisées contre la tavelure du pommier :

- d'origine minérale comme les phosphites (Felipini *et al*, 2016) et les bicarbonates (Ilhan *et al*, 2006 ; Slatnar *et al*, 2012 ; Jamar, 2011) ;
- d'origine animale comme le chitosan (Felipini *et al*, 2016) ;
- d'origine végétale comme la laminarine issue d'une algue brune (Bernardon-Méry *et al*, 2013), et toute une gamme diversifiée d'extraits de plantes, tant dans l'espèce que dans la méthode d'extraction utilisée (extraits aqueux (Gilliver, 1947), extraits alcooliques (Thiesz *et al*, 2007 ; BáLint *et al*, 2014), huiles essentielles (Nagy *et al*, 2014 ; Muchembled *et al*, 2017).

Les extraits végétaux à utilité phytosanitaire sont, de manière générale, relativement peu étudiés. La préparation et le mode d'action de la plupart d'entre eux reste à ce jour assez obscure et aléatoire, si bien que la reproductibilité de leurs résultats peut rapidement se trouver limitée. Ce mémoire de fin d'étude, se consacre à ce sujet et soulève la problématique suivante :

Les extraits végétaux peuvent-ils constituer une piste prometteuse pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires dans la gestion de la tavelure du pommier ?

Peuvent-ils notamment permettre de diminuer les doses de cuivre et de soufre, largement employés en agriculture conventionnelle et plus encore en agriculture biologique ? Les extraits testés au verger ou au laboratoire montrent-ils une efficacité significative, contre *V. inaequalis* ? Peut-on leur attribuer un mode d'action en particulier ? Quel mode d'extraction est à privilégier en termes de faisabilité, de reproductibilité mais également au regard de l'efficacité et du mode d'action recherchés ? Dans quelle mesure l'utilisation des extraits végétaux peut-elle être intégrée aux moyens mis en oeuvre pour lutter contre la tavelure chez les arboriculteurs ?

La démarche empruntée pour répondre à la problématique exposée ci-dessus, a tout d'abord consisté en une recherche bibliographique internationale (littérature scientifiques et savoirs populaires) sur les extraits végétaux employés et testés contre la tavelure du pommier *in vivo* et *in vitro*. Parallèlement à cette première étape, une expérimentation a été menée au verger avec des extraits végétaux préalablement choisis par Anne DUVAL-CHABOUSSOU. Un travail de caractérisation des extraits testés a d'autre part été réalisé sur l'ensemble de la durée de l'étude ; à la fois dans un souci de reproductibilité, tant dans la fabrication que dans l'efficacité, de ces produits complexes dont la qualité et la composition ne sont que difficilement constantes ; mais également afin d'analyser l'efficacité, voire le mode d'action (antifongique, Stimulateur des Défenses des Plantes), d'un extrait au regard de sa composition. Enfin, plusieurs séries de tests de germination sur conidies ont été entreprises au laboratoire avec les produits testés au verger et avec des extraits végétaux d'intérêt, identifiés dans la bibliographie.

La première partie de ce mémoire consistera en une synthèse bibliographique ciblée sur les extraits végétaux, et leurs composés phytochimiques, employés et testés en protection des cultures et plus spécifiquement contre la tavelure du pommier. La deuxième partie visera à étudier l'efficacité *in vivo* d'une sélection d'extraits végétaux à travers une expérimentation au verger. La troisième partie sera consacrée à exposer les tests de germination réalisés afin d'étudier l'effet d'extraits végétaux sur la germination de conidies *in vitro*. Enfin, la quatrième et dernière partie, permettra de discuter les méthodes employées, les résultats obtenus, et d'envisager les perspectives inhérentes à cette étude.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Les extraits végétaux à utilité phytosanitaire

1. Extraits végétaux et protection des plantes : présentation, avantages et limites

a. Les extraits végétaux à utilité phytosanitaire d'hier à aujourd'hui

Les extraits de plantes à utilité phytosanitaire sont emprunts d'une bien plus longue histoire que la plupart des autres pesticides, ils s'intégraient déjà à l'Antiquité aux activités agricoles des peuples. Chinois, Grecs et Romains recouraient ainsi aux préparations à bases de plantes, à côté de l'arsenic et du soufre, pour protéger leurs cultures en particulier des ravageurs comme les insectes ou les rongeurs. C'est plus tard, au siècle des Lumières (XVIIIème), que le domaine de la phytoprotection a vu les premières approches scientifiques se conjuguer aux pratiques empiriques ancestrales, pour conduire au développement de l'utilisation des extraits végétaux à la fin du XIXème siècle. A cette époque, les travaux se sont majoritairement concentrés sur les propriétés insecticides ou insectifuges des extraits ; ceux entrepris à l'égard de leur caractère antifongique sont, à l'inverse, beaucoup plus récents. (Regnault-Roger *et al*, 2008b) Délaissés au profit du développement des produits phytosanitaires de synthèse le siècle dernier, les extraits végétaux bénéficient aujourd'hui d'un regain d'intérêt notamment corrélé à la prise de conscience environnementale d'une partie de la société, et à l'engouement des consommateurs, désormais sensibles aux questions de durabilité soulevés par le modèle agricole actuel, et avertis quant à ses effets indésirables sur les organismes non cibles, pour une agriculture dite plus « naturelle ». Face à l'apparition de résistances et à des cahiers des charges de plus en plus restrictifs vis-à-vis des produits phytosanitaires, les extraits végétaux sont aussi perçus comme un outil pouvant être intégré à la mise en place d'un système de lutte alternatif (intégrant des méthodes variées d'ordre physique, biologique et génétique) en réponse aux impasses techniques rencontrées dans le cas de cultures pour lesquelles les produits phytosanitaires sont inefficaces ou inacceptables (Regnault-Roger *et al*, 2008b). Encore relativement peu étudiés par le monde de la recherche scientifique, les extraits végétaux font néanmoins l'objet d'utilisations à la ferme par certains agriculteurs. La majeure partie des connaissances disponibles à ce sujet pour les producteurs et les jardiniers amateurs, sont souvent transmises à l'occasion de formations ou de suivis techniques dispensés par des conseillers agricoles. Toute une gamme de propriétés - en autres à caractère insecticide, insectifuge, fongicide, stimulateurs de défense des plantes, antigel, herbicide... - pouvant différer en fonction de nombreux paramètres, leur sont attribuées (Bertrand *et al*, 2004 ; Rai et Carpinella, 2006 ; Petiot et Bertrand, 2008 ; Lyphout, 2015 ; AgroBio47, 2012 ; Gontier *et al*, 2008). Ces informations « phytothérapeutiques » restent assez empiriques et peu renseignées, elles sont le siège d'une importante quantité de données, parfois contradictoires, si bien qu'il est difficile d'appréhender l'efficacité, de comprendre le mode d'action, et ainsi, de maîtriser l'utilisation de produits aussi complexes que les extraits végétaux de manière reproductible.

b. Définition et délimitation dans le cadre de l'étude du terme « extraits végétaux »

L' édition 8.5 de la Pharmacopée Européenne décline les extraits végétaux en préparations « liquides obtenues par extraction (extraits fluides et teintures), semi-solides obtenues par évaporation du ou des solvants ayant servi à leur production (extraits mous et oléorésinés), et solides obtenues également par évaporation du solvant ayant servi à leur production (extraits secs) » (Della-Torre et Bellénnot, 2016). Dans la mesure où ils ne subissent pas de processus de purification, les extraits végétaux peuvent être considérés tels de véritables « cocktails » complexes de molécules, dont quelques rares sont identifiées voir quantifiées (traceurs) mais dont la plupart restent inconnues (Mairel, 2017). La notion de «**totum**» revêt une importance particulière dans la définition des extraits végétaux, elle considère en effet la complexité et l'intégrité de leur composition moléculaire. Un extrait végétal peut également se définir selon une plante, un solvant, un mode d'extraction, eux-mêmes constitués de plusieurs paramètres.

La plante

- l'espèce botanique et le chémotype : tous les genres et espèces d'une même famille botanique revêtent des caractéristiques chimiques variées. La différence peut exister au sein d'une même espèce voir d'une même variété avec des plantes appartenant à des chémotypes différents (Mairel, 2017 ; Jarić *et al*, 2015 ; Pallag *et al*, 2016)

- l'organe : la composition chimique d'une plante peut être totalement différente d'un organe à l'autre (Gilliver, 1947; Bruneton, 1999 ; Wink, 2006), aussi, un extrait est également défini par la partie de la plante utilisée pour l'élaborer (feuilles, fleurs, ensemble des parties aériennes, bois, écorces, racines, fruits,...)

- le stade physiologique des plantes (avant, pendant ou après fleur par exemple) et l'âge des organes récoltés au moment de la cueillette peuvent fortement moduler la concentration en métabolites actifs dans les végétaux et extraits qui en sont issus (Regnault-Roger *et al*, 2008a ; Jarić *et al*, 2015)

- l'état de la plante, frais ou sec (et selon les paramètres du séchage : durée, température, exposition à la lumière) entre également dans la définition d'un extrait (Gilliver, 1947; Bertrand *et al*, 2004 ; Petiot et Bertrand, 2008 ; Mairel, 2017)

Le solvant

Le solvant utilisé pour l'extraction définit la nature et la composition chimique de l'extrait qui en résulte (Mairel, 2017 ; Gurjar *et al*, 2012). Différents solvants sont utilisés en extraction végétale (eau, huile, acétone, éthanol, méthanol,...), certains étant plus particulièrement réservés à l'usage professionnel. Bien que les solvants organiques comme le méthanol ou l'éthanol permettent d'obtenir des extraits avec une activité antimicrobienne plus homogène que l'eau, celle-ci reste néanmoins le solvant universel utilisé à cet effet. Les propriétés d'un bon solvant d'extraction végétale résident dans sa faible toxicité, sa facilité d'évaporation à faible température, son incapacité à complexer ou dissocier l'extrait et sa capacité à conserver l'extrait. (Gurjar *et al*, 2012)

Le mode d'extraction

Statique ou dynamique, à chaud ou à froid, longue ou courte, unique ou répétée, la nature du procédé d'extraction est retenue pour sa sélectivité et son efficacité pour extraire les molécules recherchées. (Della-Torre et Bellenot, 2016 ; Mairel, 2017 ; Bertrand *et al*, 2004 ; Petiot et Bertrand, 2008). Ainsi, différents modes opératoires existent, parmi eux, infusion, décoction, macération, distillation par entraînement à la vapeur (huiles essentielles),... sont modulés par des paramètres de température et de durée d'extraction.

Cette étude considérera uniquement les extraits d'intérêt dans la lutte contre les maladies fongiques, et s'intéressera principalement à ceux issus de procédés d'extraction de type décoction, infusion, macération (et non des extraits fermentés) et composés d'un mélange complexe de molécules car n'ayant pas subi de purification. Les huiles essentielles, ne seront pas traitées dans le cadre de cette étude, bien que l'un des produits testé par la suite en contienne.

c. Avantages et limites des extraits végétaux

L'utilisation d'extraits végétaux en protection des cultures présente des intérêts non négligeables auxquels s'opposent néanmoins plusieurs limites.

Produits à partir de ressources renouvelables et potentiellement disponibles en quantité (Mulholland *et al*, 2017), les extraits végétaux constituent des solutions de lutte particulièrement durables. Ils sont, de par leur origine naturelle, rapidement et facilement biodégradables (Della-Torre et Bellenot, 2016 ; Gurjar *et al*, 2012), et leur intégration aux programmes phytosanitaires permettrait de diversifier les méthodes de lutte et participerait ainsi à limiter l'apparition de résistances (Della-Torre et Bellenot, 2016). De plus, la richesse et la complexité moléculaires au sein d'un même extrait, son « **totum** », peuvent lui conférer plusieurs modes d'action à la fois, sollicitant simultanément différents mécanismes physiologiques (par opposition aux pesticides ne disposant que d'une seule cible moléculaire), et ainsi retarder l'apparition de populations résistantes (Regnault-Roger *et al*, 2008a ; Wink, 2006). Enfin, les extraits végétaux, sont souvent perçus par les agriculteurs qui y ont recours comme une solution pouvant

être élaborée localement à partir de plantes présentes dans l'environnement immédiat, à moindre coût et synonyme d'autonomie. (Gurjar *et al*, 2012 ; Petiot et Bertrand, 2008)

La limite majeure à l'utilisation des extraits végétaux en agriculture réside dans leur efficacité partielle et hétérogène qui tend largement à les décrédibiliser. Leur complexité nécessite la prise en compte de nombreux paramètres, tant dans leur fabrication que dans leur application (doses, moment d'application,...). Les méthodes d'extraction ne sont pas standardisées (Gurjar *et al*, 2012) et un manque de contrôle dans la formulation des extraits (profils chimiques et dosages) pénalise la constance de leur qualité et la reproductibilité de leurs effets (Lateur, 2002 ; Gurjar *et al*, 2012 ; Mairel, 2017). D'autre part, bien que leur rapide dégradation dans l'environnement soit perçue comme un atout, elle en constitue également un inconvénient (Gurjar *et al*, 2012). Enfin, naturel n'étant pas synonyme d'innocuité, certains composés phytochimiques des extraits végétaux peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine, la plante sur laquelle ils sont appliqués (phytotoxicité), et l'environnement (Gurjar *et al*, 2012).

2. Les métabolites secondaires au service de la défense des plantes

a. Introduction aux métabolites secondaires : des composés phytochimiques variés

Présentation

Les plantes produisent deux types de métabolites : les métabolites primaires (lipides, glucides, protéines,...) produits du métabolisme primaire (respiration, photosynthèse,...) sont présentes chez toutes les espèces botaniques ; à l'inverse, l'ensemble complexe constitué des métabolites secondaires (MSs) d'une plante, varie très largement d'un individu à l'autre (espèce, organe, stade,...) (Wink, 2006 ; Regnault-Roger *et al*, 2008b ; Martínez, 2012). Ces composés biologiquement actifs ont un rôle clé dans la survie et l'adaptation écologique des plantes qui les ont développés et sélectionnés au cours du temps pour se défendre des ravageurs, des pathogènes et des plantes concurrentes (Wink, 2006 ; Martínez, 2012). Les MSs du règne végétal seraient représentés par plusieurs centaines de milliers de composés différents aux propriétés et activités variées, dont antifongiques (Wink, 2006 ; Gontier *et al*, 2008b)

Composés pré- ou post-infectionnels

Pour défendre les plantes de manière effective, les MSs se doivent d'être présents dans la plante au moment propice et à la juste concentration (Wink, 2006). Celles-ci ont ainsi développé plusieurs stratégies vis-à-vis de la production des MSs et qui permettent de distinguer ces derniers selon différentes classes d'occurrence.

Les composés **pré-infectionnels**, eux-mêmes constitués de deux sous-classes :

- les pro-inhibitines préexistantes dans la plante en quantités adéquates pour endiguer le développement de microorganismes *in vivo* ,
- les inhibitines préexistantes dans la plante en trop petites quantités en l'état pour être efficaces mais dont les teneurs augmentent suite à l'infection pour atteindre des doses toxiques.

Les composés **post-infectionnels**, également subdivisés en deux sous-classes :

- les post-inhibitines préexistantes dans la plante sous une forme inactive, elles sont converties en substances actives suite à l'infection au moyen d'une réaction biochimique courte et simple
- les phytoalexines, elles aussi toxiques et dont la biosynthèse se produit suite à l'infection par activation d'un système enzymatique latent ou par l'arrêt de la répression de certains gènes. (El Modafar *et al*, 2008)

La distribution des MSs en différentes classes de composés n'est pas nette ni évidente, par exemple, dans la mesure où un même composé peut être préexistant chez une espèce mais faire l'objet d'une synthèse suite à une infection chez une autre (Grayer et Harborne, 1994). Grayer et Harborne ont produit une synthèse du travail réalisé jusqu'à 1994 sur la caractérisation des métabolites antifongiques des plantes, ils y recensent ainsi un très grand nombre de composés qu'ils distinguent en deux groupes, les trois catégories d'inhibitines d'un côté et les phytoalexines de l'autre (Grayer et Harborne, 1994). Les composés sont listés sous forme de tableaux selon l'espèce, l'organe et la famille botanique dans laquelle ils sont présents, et le champignon contre lequel ils agissent.

Familles chimiques

Siège d'une immense diversité structurale, les MSs végétaux appartiennent à diverses familles chimiques. Les composés reconnus pour leur activité à l'encontre des agents pathogènes fongiques sont particulièrement représentés, parmi les **composés phénoliques**, les **terpènes** et les **alcaloïdes**. Cette partie s'attachera plus particulièrement à présenter certaines sous-familles de composés phénoliques comme les **acides-phénols**, les **flavonoïdes** et **isoflavonoïdes**, les **coumarines** et les **tannins**, et les **saponosides** appartenant à la famille des terpènes. Ces derniers regroupent des composés étant à la fois particulièrement impliqués dans la défense des plantes contre les champignons, et extractibles par infusion, décoction ou macération.

Les **acides-phénols** sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires qui peuvent les extraire, de préférence à partir de matériel végétal frais et à basse température (30°C) compte tenu de leur fragilité (Bruneton, 1999). Ces molécules peuvent à la fois avoir une activité fongicide mais leur très forte affinité avec les protéines peuvent également leur permettre d'inhiber des enzymes essentielles aux champignons pour infecter une plante. Beaucoup d'**acides phénols** sont reportés dans la littérature comme étant des composés constitutifs de type post-inhibitives, comme par exemple l'acide benzoïque, protocatéchique, gentsique ou encore l'acide gallique capable d'inhiber champignons pathogènes et saprophytes. D'autres dont la distribution diffuse dans la plante, tendent à s'accumuler suite à une infection, c'est par exemple le cas des acides chlorogénique, p-coumarique, férulique, caféique ou sinapique. (Grayer et Harborne, 1994)

Si les **flavonoïdes** sont presque toujours hydrosolubles et solubles dans les alcools, ce n'est pas le cas de tous (rutoside, hespéroside), ils répondent ainsi à des procédures d'extraction variables (Bruneton, 1999). Le rôle de beaucoup de **flavonoïdes** dans la protection des plantes aux pathogènes est reporté, en tant que phytoalexine ou, en tant que composé constitutif (c'est-à-dire, les différentes inhibitives). Les flavones et les flavonols sont les sous-classes de **flavonoïdes** les plus souvent associées à des activités antifongiques (Grayer et Harborne, 1994 ; Gurjar *et al*, 2012 ; Wink, 2006).

Les **coumarines**, dont la plupart sont solubles dans les alcools et dans l'eau (Bruneton, 1999), sont également riches en composés antifongiques. Parmi eux, la coumarine, la scopoletine, l'esculetine, l'herniarine, l'ombelliférone,... Les **coumarines** sont à la fois des composés dits constitutifs, mais sont également des phytoalexines connues au sein de plusieurs familles botaniques (Grayer et Harborne, 1994).

Les **tannins** dont l'effet antifongique a également été démontré (Bruneton, 1999 ; Gurjar *et al*, 2012 ; Wink, 2006) sont des molécules de stabilité variable selon leur structure et le milieu d'extraction. Ainsi, lors d'une extraction à l'eau bouillante de type décoction, certains **tannins** peuvent se décomposer plus ou moins rapidement en d'autres composés (Bruneton, 1999).

Les **saponosides** (terpènes) sont très représentés chez les végétaux, bien que présentes en quantités notables, leur extraction n'en est pas néanmoins délicate compte tenu de la forme complexe du mélange sous lequel elles se trouvent (Bruneton, 1999). L'activité antifongique des **saponosides** et leur rôle dans la défense des plantes, probablement dus à leur réaction avec les stérols membranaires de l'agent phytopathogène, est largement renseignée (Bruneton, 1999 ; Hostettmann et Marston, 2005). Ils ont fait l'objet d'études qui citent notamment des molécules comme la sarsaparilloside (Wink, 2006), l'hédéragenine, l'hédérine du lierre *Hedera helix* et l'aescine du marronnier (Grayer et Harborne, 1994).

b. Modes d'action des métabolites secondaires

Les MSs qui jouent un rôle dans la défense des plantes face aux agents pathogènes fongiques peuvent opérer selon deux modes d'action, direct ou indirect.

Effets directs

Certains MSs des plantes interfèrent directement avec l'organisme phytopathogène pour lequel ils sont toxiques. Ils peuvent avoir un effet fongicide (tue le champignon), fongistatique (bloque le développement et la reproduction des champignons) ou affectant le pouvoir pathogène du champignon (inhibition des enzymes parasitaires, blocage de la synthèse de toxines parasitaires) (El Modafar *et al*, 2008 ; Martínez, 2012). Dans cette optique, les MSs doivent être capables d'interférer avec des cibles moléculaires adéquates comme les membranes, les protéines ou les acides nucléiques (Wink, 2006)

Tableau 1 : Interaction moléculaire avec leur cible de quelques métabolites secondaires impliqués dans la défense des plantes aux agents pathogènes, d'après Michael Wink (Wink, 2006)

source : Charlotte BODART, 2018 (d'après Wink, 2006)

Interaction moléculaire		Métabolite secondaire		
Biomembranes et protéines membranaires	Interactions non-covalentes	Terpène	saponoside	sarsaparilloside
		Terpène	monoterpène	ocimene
		Terpène	monoterpène	alpha-pinene
		Terpène	sesquiterpène	cadinene
		Terpène	diterpène	phyllocladene
Protéines	Interactions covalentes	Composé phénolique	tanin	pentagalloylglucose
		Composé phénolique	tanin	dimeric procyanidin B4
		Composé phénolique	anthraquinone	hypericine
		Composé phénolique	flavonoïde	kaempferol
	Interactions spécifiques, ligand-récepteur	Composé phénolique	acide phénol	acide salicylique
		Composé phénolique	lignane	podophyllotoxine
		Terpène	diterpène	atractyloside
		Alcaloïde		hyoscyamine
		Alcaloïde		lupanine
		Alcaloïde		physostigmine
Acides nucléiques		Composé phénolique	furocoumarine	psoralen
		Terpène	sesquiterpène	ptaquiloside
		Alcaloïde		harmaline
		Alcaloïde		emetine
		Alcaloïde		sanguinarine
		Alcaloïde		dictamine

- Résistance
- 1) **Épaississement des structures pariétales**
 - rôle de barrière mécanique : inhibition de la propagation de virus de cellule à cellule et inhibition de la propagation intercellulaire de micro-organismes fongiques et bactériens
 - résistance des structures à la dépolymérisation par des enzymes produites par le micro-organisme
 - 2) **Stimulation de voies métaboliques secondaires telles que**
 - production d'antimicrobiens (phytoalexines)
 - production d'éthylène, d'acide salicylique
 - voies oxydatives
 - voie aromatique dérivée de la phénylalanine (PAL, OMT)
 - 3) **Production de protéines PR (Pathogenesis-Related) qui**
 - attaquent les structures vitales du micro-organisme (structures pariétales et membranes plasmiques : chitinases/lysozymes, β -1,3-glucanases, α -amylases, "thaumatin-like")
 - inhibent les facteurs du pouvoir pathogène émis par le micro-organisme (inhibiteurs de protéases et de polygalacturonases)
 - possèdent, pour certaines, des fonctions encore inconnues

Figure 8 : Changements métaboliques associés à la résistance des plantes

source : Lateur, 2002

- Champignons, bactéries, virus, nématodes, insectes
- Fractions de parois cellulaires de champignons et bactéries, extraits de plantes, d'algues, de champignons, de levures, de bactéries et d'insectes (glucanes, chitosanes, poly- ou oligo-saccharides)
- Phosphate de potassium et de sodium, chlorure de fer et de manganèse, silice, phosphonate de potassium, phoséthyl d'aluminium, acide borique, sulfate de cuivre
- Glycine, acide glutamique, acides α - et β -amino-butériques, D-phénylalanine, D-alanine et DL-tryptophane
- Acide salicylique, acides gallique et vanillique
- Acide D-galacturonique, acides oxalique et polyacrylique
- Acides oléique, linoléique, linoléinique et arachidonique
- Paraquat, chlorate de soude, oxyde nitrique, prohexadione-calcium
- Acide 2,6-dichloroisonicotinique, acibenzolar-S-méthyl, propenazole
- Acide jasmonique, éthylène
- Riboflavine

Figure 9 : Principaux agents aux propriétés d'activation de la résistance induite des plantes

source : Lateur, 2002

; Gurjar *et al*, 2012). Plusieurs MSs interfèrent effectivement avec la perméabilité des membranes, les plus connus sont les **saponosides**, très répandues au sein du règne végétal, les mono-, sesqui- et triterpènes sont également connus pour perturber la fluidité des membranes, ils agissent de manière non-spécifique. D'autres MSs ciblent les protéines des membranes. La plupart des MSs connus dans la nature interagiraient avec les protéines, beaucoup de façon non sélective, d'autres sont capables de moduler l'activité des protéines de manière spécifique en se liant aux sites actifs de récepteurs ou d'enzymes. L'ADN et les enzymes en relation avec l'ADN constituent également une cible moléculaire privilégiée des MSs. Le **Tableau 1** illustre ces interactions moléculaires à l'aide de quelques composés à titre d'exemple (Wink, 2006).

Effets indirects

Les MSs peuvent également avoir un mode d'action indirect en induisant des changements métaboliques associés à la résistance au sein de la plante, avec notamment l'épaississement des structures pariétales de la plante, la stimulation du métabolisme secondaire (pour produire d'autres MSs impliqués dans la résistance), ou la production de **protéines PR** (Pathogenesis-Related) (**Figure 8**) (Lateur, 2002 ; Pajot et Regnault-Roger, 2008). Lateur développe les perspectives offertes par la résistance systémique induite (par opposition à la résistance spécifique) qui peut être provoquée par des traitements à l'aide de composés naturels. Il montre en effet que ces réactions de stimulation des mécanismes de défense de la plante ne sont pas spécifiques et peuvent être induits par une diversité impressionnante d'agents dont les extraits de plantes et leurs composés (**Figure 9**). Les composés phénoliques font partie des MSs à effet indirect, il a ainsi été démontré que certains (lignine et subérine) ont la propriété de renforcer les parois végétales en formant une barrière mécanique qui protège de l'action des enzymes et empêche le passage des toxines du champignon vers la plante et des nutriments de la plante vers le champignon (El Modafar *et al*, 2008 ; Martínez, 2012). Certains comme les hydroxycoumarines et l'épicatéchine sont capables d'induire la biosynthèse de **phytoalexines**, la scopolétine et de l'acide salicylique sont impliqués dans le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité, tandis que d'autres, comme certains flavanes ou tannins, parviennent à priver l'agent pathogène de ressources nutritives en complexant et réduisant la disponibilité en ions essentiels (El Modafar *et al*, 2008).

Cas particulier du pommier et de *V. inaequalis*

Plusieurs études ont montré l'implication prononcée de composés phénoliques dans la résistance du pommier à *V. inaequalis* (Treutter et Feucht, 1990 ; MacHardy, 1996 ; Mayr *et al*, 1997 ; Lateur, 2002 ; El Modafar *et al*, 2008). Certains flavonoïdes, les **flavan-3-ols**, en augmentant et en s'accumulant dans les tissus infectés par *V. inaequalis* créeraient un environnement toxique pour le pathogène ainsi restreint dans son développement (El Modafar *et al*, 2008). Treutter et Feucht ont très tôt montré que les cultivars résistants contenaient des teneurs en **flavan-3-ols** 3 à 6,5 fois plus hautes dans leurs tissus que dans ceux des cultivars sensibles (Treutter et Feucht, 1990). Grayer et Harborne indiquent néanmoins que d'autres études n'ont pas permis de prouver la corrélation positive en résistance à la tavelure **flavan-3-ols** préformés (Grayer et Harborne, 1994). Un autre flavonoïde, la phlorétine (accompagné de la phloridzine et de l'acide phlorétique), fait également l'objet de controverses quant à son rôle dans la résistance des pommiers à la tavelure. Sa teneur augmentant avec celle de la résistance à la tavelure, la phlorétine s'est vu attribué un rôle directe dans la défense du pommier contre *V. inaequalis* (Lateur 2002), Grayer et Harborne rapportent néanmoins que ce composé n'aurait pas d'action antifongique à l'inverse d'une quinone en laquelle ils se transforment, qui serait elle un composé fongicide (Grayer et Harborne, 1994).

B. Extraits végétaux et lutte contre *V. inaequalis* : état des connaissances

Cette seconde partie se veut un état des connaissances scientifiques et empiriques existantes autour de l'utilisation d'extraits végétaux à utilité phytosanitaire dans la maîtrise de la tavelure du pommier. Une recherche bibliographique internationale a ainsi recensé les travaux de recherche et d'expérimentation réalisés à ce sujet, à côté des usages et recommandations qui en sont déjà faites sur le terrain. Ces informations sont traitées dans un tableau scindé en deux parties, la plus conséquente d'entre elles est réservée aux extraits ayant fait l'objet d'études scientifiques (**Tableau 2.a**). Pour chaque référence, elle

Tableau 2.a : Inventaire des expérimentations relatives à l'utilisation d'extraits végétaux pour la maîtrise de la tavelure du pommier - littérature scientifique internationale

source : Charlotte BODART, 2018

Espèce botanique	Nature de l'extrait/Mode d'extraction	Molécule active	Dose	in vivo				in vitro		COMMENTAIRES	SOURCE
				VERGER		PLANTULES	SPORES				
				NbOT	Lésions		A	C			
Fe	Fr	Fe	Fr								
<i>Artemisia annua</i>	Alcoolique	Artemisine	3%					X		Antigerminatif. Hyphes des A germées ont un développement normal	Thiesz et al 2007
<i>Artemisia annua</i>	Alcoolique	Artemisine	6%					X		Antigerminatif. Hyphes des A germées ont un développement normal	Thiesz et al 2007
<i>Chelidonium maius</i>	Alcoolique	Chelidonine	3%					X		Antigerminatif. Hyphes des A germées sont plus développés que dans les autres traitements	Thiesz et al 2007
<i>Chelidonium maius</i>	Alcoolique	Chelidonine	6%					X		Antigerminatif. Hyphes des A germées plus développés que dans les autres traitements	Thiesz et al 2007
<i>Mentha piperita</i>	Alcoolique	Menthol	3%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées sont très courts et peu viables	Thiesz et al 2007
<i>Mentha piperita</i>	Alcoolique	Menthol	6%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées sont très courts et peu viables	Thiesz et al 2007
<i>Populus nigra</i>	Alcoolique	Populine	3%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Thiesz et al 2007
<i>Populus nigra</i>	Alcoolique	Populine	6%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts. Traitement avec le plus haut niveau de spores non germées de l'essai	Thiesz et al 2007
<i>Salvia sclarea</i>	Alcoolique	Linalol + Linalyl acetate	3%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Thiesz et al 2007
<i>Salvia sclarea</i>	Alcoolique	Linalol + Linalyl acetate	6%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Thiesz et al 2007
<i>Thymus vulgaris</i>	Alcoolique	Thymol	3%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Thiesz et al 2007
<i>Thymus vulgaris</i>	Alcoolique	Thymol	6%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Thiesz et al 2007
<i>Artemisia annua</i>	Hexane	Artemisine	1%					X			Bálint et al, 2014
<i>Artemisia annua</i>	Hexane	Artemisine	3%					X			Bálint et al, 2014
<i>Chelidonium maius</i>	Hexane	Chelidonine	1%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées de longueur quasi-normale	Bálint et al, 2014
<i>Chelidonium maius</i>	Hexane	Chelidonine	3%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées de longueur quasi-normale	Bálint et al, 2014
<i>Thymus vulgaris</i>	Hexane	Thymol	1%					X			Bálint et al, 2014
<i>Thymus vulgaris</i>	Hexane	Thymol	3%					X			Bálint et al, 2014
<i>Populus nigra</i> bourgeons	Hexane	Populine	1%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Bálint et al, 2014
<i>Populus nigra</i> bourgeons	Hexane	Populine	3%					X		Antigerminatif - Hyphes des A germées courts.	Bálint et al, 2014
<i>Populus nigra</i> bourgeons	Hexane	Populine	1%					X		Sévérité d'infestation significativement réduite: /témoin non traité chaque année; /traitement conventionnel sur la 1ère année de l'essai	Bálint et al, 2014
<i>Hedera helix</i>	Aqueux							X			Bengtsson et al, 2004
<i>Saponaria officinalis</i> racine								X			Bengtsson et al, 2004
<i>Yucca schidigera</i> (Norponin®)			5%					X			Bengtsson et al, 2006; Bengtsson et al, 2009
<i>Yucca schidigera</i> (Norponin®)			5%					X		Fongitoxique et stimulateur des défenses. Antifongique en inhibant germination et pénétration des conidies dans les tissus, également effet sur le système de défense (expression de gènes suite au traitement similaire au produit témoin inducteur de résistance)	Bengtsson et al, 2009

Littérature scientifique

Légende

NbOT	Nombre d'organes tavelés (fréquence d'infestation)	Efficacité	
Lésions	Importance des lésions (intensité d'infestation)	xx	Très bonne
Fe	Sur feuilles	X	Bonne
Fr	Sur fruits	X	Moyenne
A	Ascospores	X	Faible
C	Conidies	X	Non significative

indique les extraits testés (plante, nature du solvant et/ou mode d'extraction, molécule active, dose) et les résultats observés (sur une échelle allant d'une efficacité « très bonne » à « non significative » selon la nature de l'expérimentation (*in vivo* dans un verger productif, sur des plantules ou des jeunes plants généralement sous serre, ou *in vitro* sur conidies ou ascospores de *V. inaequalis*). Des commentaires peuvent fournir des informations complémentaires aux résultats, et renseigner parfois sur le mode d'action supposé ou démontré de l'extrait. La seconde partie du tableau (**Tableau 2.b**) regroupe les informations issues de la littérature populaire et d'une enquête menée auprès d'arboriculteurs, de conseillers et de formateurs, en Agriculture Biologique.

1. Des études de natures diverses et variées

a. Une diversité de plantes et de modes d'extraction

La nature des extraits végétaux testés ou employés à l'encontre de *V. inaequalis* est spécialement diversifiée, tant dans l'espèce botanique utilisée que dans son mode d'extraction, tous deux déterminants des molécules actives composant l'extrait, auxquelles s'ajoutent les doses expérimentées.

Plus d'une quarantaine d'espèces botaniques sont ainsi citées, la famille des LAMIACEAE est particulièrement représentée, avec notamment le thym *Thymus vulgaris* faisant l'objet de plusieurs études (Thiesz *et al*, 2007 ; BáLint *et al*, 2014 ; Nagy *et al*, 2014 ; Muchembled *et al*, 2017).

Parmi les produits testés, certains ont été extraits à l'eau, mais la plupart sont des extraits alcooliques ou des huiles essentielles issues d'un processus de distillation (à l'exception des essences d'agrumes, obtenues par expression à froid par pressage (Fernandez et Chémat, 2012)). A l'inverse, l'ensemble des plantes citées dans la littérature populaire ou provenant de savoirs ancestraux, sont extraites à l'eau par des modes opératoires simples de décoction, d'infusion ou de macération.

b. Une distribution inégale des études menées *in vitro* et *in vivo*

Une majeure proportion des travaux de recherches a consisté à étudier la capacité des extraits végétaux à empêcher la germination et le développement des spores asexuées (conidies) ou sexuées (ascospores) de *V. inaequalis in vitro* (Gilliver, 1997 ; Bengtsson *et al*, 2006 ; Thiesz *et al*, 2007 ; Nagy *et al*, 2014 ; Muchembled *et al*, 2017;...). Ce type d'étude permet uniquement de conclure sur les propriétés antifongiques de l'extrait, mais ne permet pas de juger ses capacités à stimuler les défenses du pommier face à *V. inaequalis*. Ce dernier point pourrait notamment être exploré au moyen d'expérimentations *in vivo* au verger ou sous serre sur plantules, confrontées à des tests de germination. La bibliographie recense relativement peu d'études menées sur pommier, certaines montrent néanmoins l'intérêt de certains extraits dans la maîtrise de la tavelure avec des effets significatifs notables sur le développement de la maladie sur feuilles et/ou sur fruits (Navarro *et al*, 2013 ; BáLint *et al*, 2014 ; Marchand *et al* 2014 ; Jamar, 2011)

c. Des connaissances issues de recherches scientifiques et de pratiques et savoirs empiriques

Comme le remarquent déjà les paragraphes précédents, des différences notables séparent les informations provenant des deux domaines de connaissances. En dehors du mode d'extraction, il est important de remarquer que la plupart des extraits provenant des pratiques populaires n'ont pas été expérimentés dans le domaine académique, et ne peuvent ainsi pas bénéficier du crédit que pourrait potentiellement leur apporter ce type d'études.

2. Extraits, plantes, et molécules d'intérêt dans la lutte contre la tavelure du pommier

a. Les plantes à saponosides

Parmi les plantes dont l'efficacité des extraits a été évaluée avec succès au sein des différents articles, il s'avère que nombre d'entre elles sont des espèces connues de la pharmacopée pour leurs teneurs en **saponosides** comme, *Yucca schidigera*, *Hedera helix*, *Saponaria officinalis*, *Ranunculus ficaria*, *Quillaja saponaria*, *Medicago lupulina* (Bruneton, 1999 ; Hostettmann et Marston, 2005), *Primula vulgaris*, *Caltha palustris* (Hostettmann et Marston, 2005) ou encore *Aesculus hippocastanum* (Grayer et Harborne, 1994). Les extraits issus de certaines de ces espèces se sont avérés particulièrement prometteurs dans leur capacité à la fois à inhiber la germination des spores de *V. inaequalis in vitro* et à maîtriser le développement de symptômes de tavelure *in vivo*, c'est notamment le cas du lierre *Hedera helix* (Gilliver, 1947 ; Bengtson *et al*, 2004), la saponaire *Saponaria officinalis* (Bengtson *et al*, 2004) les spécialités commerciales Norponin® à base de *Yucca schidigera* (Bengtsson *et al*, 2006 ; Bengtsson *et al*, 2009 ; Jamar 2011) et QL AGRI TM 35 à base de *Quillaja saponaria* (Jamar, 2011).

b. Autres extraits végétaux d'intérêt

En dehors des substances végétales citées ci-dessus pour leur richesse en **saponosides**, plusieurs autres extraits de plantes ont montré des effets intéressants de maîtrise de la tavelure du pommier. En 1947, Gilliver avait déjà identifié plus de quatre cents espèces botaniques dont les extraits (plante séchée, réduite en poudre et diluée dans de l'eau distillée) inhibaient complètement, à doses variables, la germination du champignon en conditions expérimentales *in vitro* (Gilliver, 1947). Des études plus récentes relèvent notamment les propriétés antifongiques d'extraits de peuplier *Populus nigra* (Thiesz *et al*, 2007 ; BáLint *et al*, 2014). Thiesz *et al*. montrent d'abord en 2007 le pouvoir anti germinatif d'extraits alcooliques de *Populus nigra* (l'organe utilisé n'est pas précisé) à côté de trois autres espèces sur ascospores de *V. inaequalis in vitro* à une dose de 6%, d'autant plus prononcé à la dose 3%. Quelques années plus tard, ces résultats sont confirmés par une équipe de chercheurs turcs qui teste à nouveau un extrait de *Populus nigra* (bourgeons) à côté des mêmes espèces botaniques (cette fois extraites à l'hexane). Leurs résultats indiquent non seulement l'efficacité antifongique de l'extrait à faible dose (1%) sur conidies *in vitro*, mais montrent également, au verger, une sévérité d'infestation sur fruits significativement réduite (BáLint *et al*, 2014).

Tableau 2.a - suite : Inventaire des expérimentations relatives à l'utilisation d'extraits végétaux pour la maîtrise de la tavelure du pommier - littérature scientifique internationale

source : Charlotte BODART, 2018

Plante	Extrait	Quantité	Etat	Extraction	Solvant	Dilution	Source
<i>Eucalyptus citriodora</i>	HE	71% citronellal					Muchembled et al 2017
<i>Syzygium aromaticum</i> (clou)	HE	92% eugenol					Muchembled et al 2017
<i>Mentha spicata</i>	HE	59% carvone, 24% limonene					Muchembled et al 2017
<i>Satureja montana</i>	HE	41% carvacrol, 18% γ terpinene					Muchembled et al 2017
<i>Origanum compactum</i>	HE	40% carvacrol, 20% γ terpinene, 18% thymol					Muchembled et al 2017
<i>Melaleuca alternifolia</i>	HE	39% terpinen-4-ol, 22% γ terpinene					Muchembled et al 2017
<i>Thymus vulgaris</i>	HE	51% thymol					Muchembled et al 2017
<i>Artemisia absinthium</i> feuilles	Alcoolique		X				Navarro et al, 2013 ; Marchand et al 2014
<i>Artemisia vulgaris</i> feuilles et fleurs	Infusion ¹ ; Alcoolique ²		X ¹ X ²				Navarro et al, 2013 ; Marchand et al 2014
<i>Equisetum arvense</i> feuilles	Infusion ¹ ; Alcoolique ²		X ¹ X ²				Navarro et al, 2013 ; Marchand et al 2014
<i>Salix alba</i> feuilles ou écorces	Infusion ¹ ; Alcoolique ²		X ¹ X ²				Navarro et al, 2013 ; Marchand et al 2014
<i>Mentha piperita</i>	Infusion ¹ ; Alcoolique ²		X ¹ X ²				Navarro et al, 2013
<i>Juncus effusus</i> médulle (tissu interne de la tige)	Acétate d'éthyle	4,9%					Thuerig et al, 2016
<i>Juncus effusus</i> médulle (tissu interne de la tige)	Acétate d'éthyle	50%					Thuerig et al 2016
<i>Juncus effusus</i> médulle (tissu interne de la tige)	Acétate d'éthyle	100%			X		Thuerig et al, 2016
Orange peel (Prev-B2, 100%)				X			Jamar, 2011
<i>Quillaja saponaria</i> soapbark tree (QL-AGRI TM 35, 99.8%)				X			Jamar, 2011
<i>Camellia oleifera</i> tea seed, <i>Chenopodium quinoa</i> quinoa seed (Teawet TM TQ Liquid, 99.8%,)				X			Jamar, 2011
Grapefruit seed (Citripur, 33%)				X			Jamar, 2011
<i>Citrus sp</i>				X**			Pfeiffer et al, 2004
<i>Galea officinalis</i>				X**			Pfeiffer et al, 2004
<i>Inula viscosa</i>				X**			Pfeiffer et al, 2004
<i>Quillaja saponaria</i>				X**			Pfeiffer et al, 2004
<i>Polypodium vulgare</i>				X**			Pfeiffer et al, 2004
<i>Saponaria officinalis</i>				X**			Pfeiffer et al, 2004

Tableau 2.b : Inventaire des expérimentations relatives à l'utilisation d'extraits végétaux pour la maîtrise de la tavelure du pommier - savoirs populaires

source : Charlotte BODART, 2018

Savoirs populaires	Extraits végétaux appliqués et recommandés pour maîtriser la tavelure du pommier au verger						
	EXTRAIT VÉGÉTAL CONSIDÉRÉ						
	Plante			Extrait			SOURCE
Espèce botanique	Organe	Quantité	Etat	Extraction	Solvant	Dilution	
<i>Thymus serpyllum</i>	Parties aériennes	25g/L	sec	Infusion	Eau		Petiot et Bertrand, 2008
<i>Satureia montana</i>	Parties aériennes	25g/L	sec	Infusion	Eau		Petiot et Bertrand, 2008
<i>Syzygium aromaticum</i>	Feuilles	25g/L	sec	Infusion	Eau		Petiot et Bertrand, 2008
<i>Sambucus nigra</i>	Feuilles	25g/L	sec	Infusion	Eau		Petiot et Bertrand, 2008
<i>Equisetum arvense</i>	Parties aériennes	10g/L	sec	Décoction 30'	Eau		Petiot et Bertrand, 2008
<i>Quercus robur</i>	Écorces	100g/L	sec	Macération 72h	Eau	7%	Communication personnelle
<i>Betula alba</i>	Feuilles ou écorces		sec	Décoction 30'	Eau		Communication personnelle

II - ETUDE DES EXTRAITS *IN VIVO* SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA TAVELURE DU POMMIER AU VERGER

A. Objectifs de travail et hypothèses

Les méthodes de soin des plantes par les plantes ont fait l'objet d'études scientifiques rigoureuses et poussées, mais jusqu'à lors, peu nombreuses. Néanmoins, les travaux de recherche relatifs aux extraits végétaux pour la protection des cultures sont aujourd'hui amenés à se multiplier en raison du contexte agricole européen actuel de réduction des produits phytosanitaires et qui se traduit par un vif engouement pour des moyens de lutte d'origine « naturelle ». A l'heure actuelle, une majorité des références disponibles à ce sujet réside dans des savoirs populaires. Ceux-ci sont en grande partie divulgués par quelques grandes figures autodidactes de la phytothérapie végétale, à travers les ouvrages qu'elles publient, les enseignements qu'elles dispensent dans leurs centres de formation, ou les journées techniques (organisées par les chambres d'agriculture, les associations de développement de l'Agriculture Biologique,...) qu'elles animent.

Le volet de ce mémoire a pour but de tester des traitements à base de plantes décrits comme ayant des effets contre la tavelure du pommier, mais dont l'efficacité n'a pas encore été scientifiquement prouvée, de comparer leurs efficacités et d'en comprendre l'origine. Dans cette optique, deux objectifs dépendants sont poursuivis :

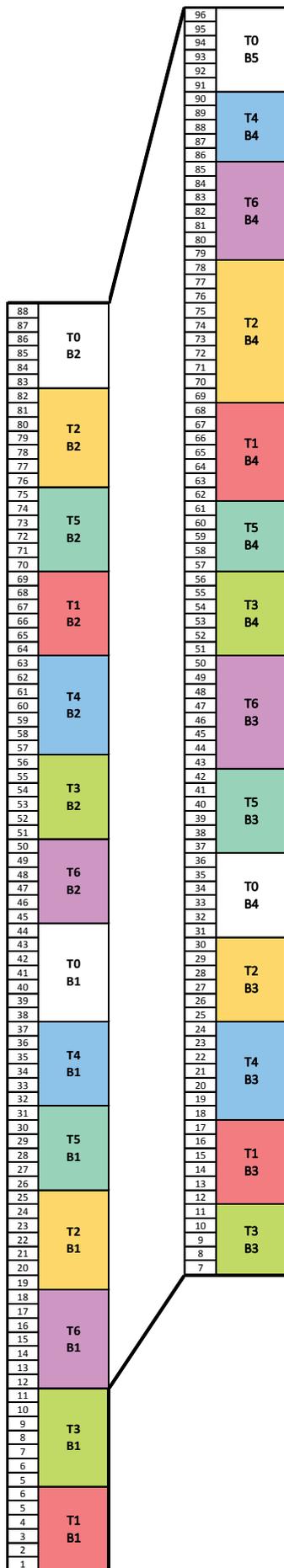
- Le premier vise à mettre une sélection de traitements à base d'extraits végétaux, préconisés par certains experts pour lutter contre la tavelure du pommier, à l'épreuve de l'expérimentation en conditions de production. Il concourt plus précisément à étudier le potentiel des extraits à réduire les quantités de cuivre utilisées dans les vergers de pommier en vue de lutter contre la tavelure lors de l'application de traitements cupriques (soit la quasi-totalité des traitements contre la tavelure en Agriculture Biologique et certains en agriculture conventionnelle).
- Le second cherche à caractériser chimiquement les extraits végétaux testés. Il recourt à des notions de phytochimie, discipline qui, intégrée à une fine connaissance des pathosystèmes, est essentielle à la compréhension de l'activité phytosanitaire des extraits végétaux, soit à l'appréhension de leurs efficacités et modes d'action (dont dépendent à la fois l'optimisation de leur principe de fabrication et d'application).

Les hypothèses de travail suivantes ont été considérées pour cette expérimentation :

- L'essai se situe dans une parcelle conduite en conventionnel, et reçoit de fait des traitements à vocation herbicide, insecticide, acaricide ou éclaircissante pouvant contenir des substances actives (soufre, calcium par exemple) vis-à-vis de *V. inaequalis*. Le premier postulat consiste ainsi à considérer que ces produits appliqués dans les lignes concernées par l'essai n'interagissent ni directement avec le champignon ou avec les défenses de l'arbre, ni avec les extraits végétaux testés (potentialisation, synergie ou antagonisme).
- Le mode d'action biocide ou stimulateur des défenses des extraits végétaux testés dans le cadre de cette expérimentation n'est pas connu. Le second postulat vise à simplement les considérer comme étant des produits de traitement à appliquer au verger de manière préventive et non curative.
- L'efficacité des traitements cupriques est corrélée positivement à la quantité de cuivre métal qui est appliquée.
- Les traitements sont considérés comme étant lessivés au-delà de 20mm de précipitations.
- Qu'ils soient biocides ou impliqués dans des mécanismes de défense du pommier, ce sont les métabolites secondaires des plantes qui expliquent l'effet des extraits végétaux à l'encontre de la tavelure.

B. Matériel et méthodes

L'exposition du matériel et des méthodes employées pour l'étude des extraits végétaux *in vivo* est organisée en deux temps : l'expérimentation mise en place au verger, suivie d'un travail de caractérisation des extraits.



T0	TEMOIN NON TRAITE
T1	REFERENCE BIO
T2	1/2 REFERENCE BIO
T3	T2 + HE origan et HE clou de girofle
T4	T2+ Décoction de racines d'ortie
T5	T2 + Infusion de feuilles de sureau, serpolet et clou de girofle
T6	T2+ Décoction de prêle

Figure 10 : Plan de l'expérimentation au verger menée à la Morinière
source : Charlotte BODART, 2018

1. Expérimentation au verger

Le dispositif expérimental mis en place et les observations réalisées dans le cadre de cette expérimentation ont été guidés par la norme définie par l'OEPP qui décrit « la conduite des essais pour l'évaluation biologique des fongicides contre *Venturia inaequalis* agent de la tavelure du pommier ».

a. Conditions expérimentales (matériel végétal et plan d'expérimentation) (Figure 10)

a-1. Conditions d'essai (matériel végétal, parcelle)

Les conditions expérimentales de cet essai se sont voulu celles d'un verger en conditions réelles de production. Une des cinquante parcelles du domaine de la Morinière a ainsi accueilli l'expérimentation qui a été mise en place sur deux rangs distants de quatre mètres, avec une distance de plantation d'un mètre entre les arbres sur le rang. Historiquement les pommiers sur lesquels a été mené l'essai ont été implantés en 2002 avec un porte-greffe de variété Pajam® 1 et un greffon de variété Golden, ils ont été surgreffés en 2015 avec la variété Galaval, sensible à la tavelure. La parcelle concernée par cette expérimentation est conduite en agriculture conventionnelle, les conditions de culture (fertilisation, travail de sol, irrigation), l'ensemble des traitements phytosanitaires (en dehors de ceux destinés à lutter contre la tavelure du pommier) et les travaux d'éclaircissage y sont uniformes.

a-2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental a été établi selon un dispositif en blocs de Fisher, avec pour objets : les produits à étudier, à savoir quatre extraits végétaux, des produits de référence au nombre de deux, et, un témoin non traité. Le terrain expérimental a ainsi été divisé en (M*R) parcelles élémentaires (ou unités expérimentales) égales, avec M le nombre de modalités (ou de niveaux du traitement) et R le nombre de répétitions (ou blocs), avec M=7 modalités et R=4 répétitions. Les deux rangs de l'expérimentation ont été divisés en quatre blocs (deux sur chaque rang), eux même subdivisés en sept unités, correspondant à chaque modalité, réparties aléatoirement au sein du bloc, soit un total de 24 parcelles élémentaires. A noter qu'un « bloc » est ici un groupe homogène d'unités expérimentales au sein duquel sont appliqués et comparés les traitements. Ce type de dispositif a pu être choisi car le nombre de modalités est limité (<15) et il permet de prendre en compte l'hétérogénéité du terrain, c'est le plus fréquemment utilisé en expérimentation agronomique de plein champ. Chaque parcelle élémentaire compte six pommiers, dont deux font office de bordure de part et d'autre de l'unité, et mesure environ 25 mètres carrés. Une surface d'approximativement 100 mètres carrés est ainsi dédiée à chaque modalité.

b. Exécution des traitements

b-1. Choix et préparation des traitements

Produits de référence et témoin non traité (Tableau 3)

Les différentes modalités de l'essai incluent un témoin non traité T0 et deux produits de référence pour T1 et T2.

- Le produit de la modalité T1 est un mélange de Vivacuire, une spécialité commerciale à 18% de cuivre métal, et de Microthiol Spécial Disperss, une spécialité commerciale à base de soufre (80%). Il est appliqué à la même dose que dans les parcelles conduites en Agriculture Biologique à la Morinière et correspond à la « Référence bio », soit 0,90kg de Vivacuire par hectare et 5kg de Microthiol Spécial Disperss par hectare.

- Le produit de la modalité T2 est un mélange des deux mêmes spécialités commerciales que T1, à la seule différence que la quantité de Vivacuire est divisée par deux, et correspond à la « ½ référence bio », soit 0,45kg de Vivacuire par hectare et 5kg de Microthiol Spécial Disperss par hectare.

Produits à étudier (Tableau 4)

Le choix des produits à étudier a été effectué par Anne DUVAL-CHABOUSSOU en amont du stage à l'origine de ce mémoire. Forte d'un passé professionnel d'une dizaine d'années comme conseillère en viticulture biologique et spécialiste des extraits végétaux à utilité phytosanitaire à la Chambre d'Agriculture de



Figure 11 : Préparation d'une décoction de racine d'ortie et d'une décoction de prêle (gauche à droite)
source : Charlotte BODART, La Morinière, 21/03/2018



Figure 12 : Plantes séchées pour l'infusion «trois plantes» : feuilles de sureau, clous de girofle, serpolet (gauche à droite)
source : Charlotte BODART, 2018



Figure 13 : Plantes séchées conditionnées dans des sachets en papier
source : Charlotte BODART, la Morinière, 13/07/2018



Figure 14 : Fabrication de l'infusion «trois plantes»
source : Charlotte BODART, la Morinière, 13/07/2018

la région Pays de la Loire, Anne DUVAL-CHABOUSSOU a retenu quatre extraits de plantes pour cette première expérimentation au verger. Sa sélection s'est à la fois appuyée sur son expertise personnelle et sur des savoirs populaires contenus dans l'ouvrage « Les soins naturels aux arbres » d'Eric PETIOT (Petiot et Bertrand, 2008). Ainsi, les quatre modalités de l'essai restantes sont toutes constituées du mélange de cuivre et de soufre de la modalité T2 « ½ référence bio » auquel, ont respectivement été ajoutés les extraits végétaux suivants :

- Pour la modalité T3, un mélange d'huiles essentielles : 1/3 HE *Origanum compactum* et 2/3 *Syzygium aromaticum* élaboré selon l'expertise d'Anne DUVAL-CHABOUSSOU et les recommandations de la société «Purins d'ortie et Cie», fournisseurs d'extraits végétaux.

- Pour la modalité T4, une décoction de racines d'ortie *Urtica dioica*, choisie d'après Eric PETIOT (Petiot et Bertrand, 2008).

- Pour la modalité T5, une infusion de trois plantes en proportions égales : feuilles de sureau *Sambucus nigra*, feuilles et fleurs de serpolet *Thymus serpyllum*, clous de girofle *Syzygium aromaticum*, d'après Eric PETIOT (Petiot et Bertrand, 2008) et selon l'expertise d'Anne DUVAL-CHABOUSSOU. Cette préparation peut prendre le nom d'infusion «trois plantes» dans la suite du texte.

- Pour la modalité T6, une décoction de parties aériennes de prêle des champs *Equisetum arvense* choisie d'après le livre Eric PETIOT (Petiot et Bertrand, 2008).

Fabrication des extraits

Comme exposé précédemment le mode de fabrication d'un extrait végétal intègre de nombreux paramètres. Dans le cadre de cette expérimentation, ont été considérés :

- pour la **plante** : son espèce, la partie utilisée, son état (sec ou frais).

- pour le **solvant** : sa nature, son pH

- pour l'**extraction** : sa nature (macération, infusion, décoction,...), sa durée, sa température.

La préparation des extraits a suivi les indications données par Eric PETIOT dans son livre « Les soins naturels aux arbres (Petiot et Bertrand, 2008). Ceux-ci ont ainsi été réalisés avec des plantes sèches (achetées chez un fournisseur au savoir-faire reconnu, certifié en Agriculture Biologique (**Figure 13**)) à raison de 50g par litre d'eau de pH neutre (pH de l'eau courante à la Morinière).

Les extraits de racines d'ortie et l'extrait de prêle ont été préparés selon le même mode opératoire, une macération à froid de vingt-quatre heures (**Figure 11**), suivie d'une décoction à couvert de trente minutes à petit bouillon (90°C-95°C) sur une plaque de cuisson électrique. Les extractions du mélange de feuilles de sureau, serpolet et clous de girofle (**Figure 12**) ont été effectuées par infusion. Les plantes et le solvant sont portés à 90°C et retirés aussitôt de la plaque de cuisson (**Figure 14**). La phase de cuisson terminée, les préparations doivent refroidir avant d'être filtrées à l'aide d'un filtre à café solide, et embouteillées dans des contenants adaptés à la conservation des extraits : opaques et dotés d'un second bouchon pour éviter le contact du liquide avec l'air. Dans les conditions de fabrication artisanales dans lesquelles ont été réalisées les extractions, un volume d'approximativement 750ml d'eau est nécessaire pour obtenir 500ml d'extrait, ceci est lié à l'évaporation lors de la cuisson, et à l'état sec des plantes qui se gorgent de solvant. 37,5g de plantes sèches ont ainsi été extraites dans 750ml d'eau pour chacune des trois préparations (12,5 g de chaque plante pour l'infusion «trois plantes»). Dans un souci de qualité, les extraits sont conservés en chambre froide pendant une période n'excédant pas la dizaine de jours suivant leur fabrication. Ils ont ainsi été préparés tout au long de la campagne de traitement, dans des quantités permettant d'assurer deux applications selon la fréquence de traitement hebdomadaire. Les extraits sont conservés dans des bidons de 500ml assurant individuellement un seul traitement.

Les huiles essentielles d'*O. compactum* et de *S.aromaticum* de la modalité T4 ont été achetées en l'état et ont simplement été mélangées et dispersées au moment du traitement.

Doses et volumes

Les pommiers sont traités avec un volume total de bouillie de 500L/ha quelque soit le stade végétatif. Les volumes et les doses de traitement ont été adaptés à la surface à traiter par modalité (environ 100m²). Le traitement d'une surface de 100m² requiert ainsi un volume de bouillie de 5L. Le volume total de bouillie doit cependant être ajusté aux subtilités techniques de pulvérisation inhérentes aux particularités du matériel de traitement, en considérant à la fois le volume mort de la cuve et le volume

Tableau 3 : Modalités témoin et produits de référence

source : Charlotte BODART, 2018

Modalité	Spécialité commerciale			Matière active		
	Nom	Etat	Dose en kg/ha	Nom	Proportion	Dose en kg/ha
T0	Témoin non traité					
T1	Vivacuire MSD	solide	0,90	Cuivre	18%	0,162
		solide	5,00	Soufre	80%	4,00
T2	Vivacuire MSD	solide	0,45	Cuivre	18%	0,081
		solide	5,00	Soufre	80%	4,00

Tableau 4 : Modalités extraits végétaux

source : Charlotte BODART, 2018

Modalité	Plante			Solvant		Extraction		
	Espèce botanique	Partie utilisée	Etat	Nature	pH	Type	Température	Durée
T3	T2 + HE origan et HE clou de girofle							
T4	<i>Urtica dioica</i>	racines	sec	eau	neutre	décoction	90-95°C	30 minutes
T5	<i>Sambucus nigra</i>	feuilles	sec	eau	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes
	<i>Thymus serpyllum</i>	feuilles, fleurs	sec	eau	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes
	<i>Syzygium aromaticum</i>	boutons floraux	sec	eau	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes
T6	<i>Equisetum arvense</i>	parties aériennes	sec	eau	neutre	décoction	90-95°C	30 minutes



Figure 15 : Atomiseur automoteur Yonisos

source : la Morinière, 10/04/2013

nécessaire à l'amorçage. Ainsi, les spécificités du pulvérisateur d'expérimentation utilisé imposent à la fois d'augmenter le volume de bouillie de 15% pour couvrir le volume mort de la cuve, et d'ajouter 3 litres de bouillie supplémentaires destinés à l'amorçage de la pompe. Le volume total de bouillie à préparer pour une modalité de 100m² s'élève ainsi 8,8 litres.

La dilution de l'extrait dans la bouillie de traitement a été calculée de sorte que la quantité de plantes sèches utilisée pour un hectare revienne aux 1250g conseillés par Eric PETIOT (500g de plantes sèches pour traiter un hectare à 200 L/ha, soit 1250g de plantes pour un hectare à 500L/ha), c'est-à-dire 12,5g de plantes sèches pour 100m². Etant donné que les extraits végétaux ont été préparés à raison de 37,5g de plantes sèches pour 750ml d'eau (soit 50g/L), pour utiliser 12,5g de plantes sèches sur 100m² un volume de 250ml d'extrait doit être appliqué dans chaque modalité. En prenant en compte la quantité d'extrait perdue par le volume mort et l'amorçage, la bouillie de traitement totale de 8,8 L doit contenir 440ml d'extrait de sorte à atteindre 250ml d'extrait réellement prélevés et pulvérisés sur les arbres. Les 440 ml d'extraits végétaux sont dilués au laboratoire dans un bidon d'un litre de sorte à ce que, au local phytosanitaire, le technicien en charge des traitements ait simplement à en verser le contenu dans la cuve concernée qu'il aura préalablement chargée avec 7,8 litres d'eau contenant le cuivre et le soufre dans les quantités de la « ½ référence bio », tous deux initialement sous forme de poudre. Cependant, du fait des contraintes imposées par le terrain, toutes les modalités ne mesurent pas exactement 100m², leur surface varie effectivement de 92m² pour la plus petite à 120m² pour la plus grande. Les doses de produits et les volumes de traitement ont été calculés en conséquence, sur mesure pour chacune des sept modalités de l'essai, dans le **Tableau 5**.

Concernant la modalité T4, Anne DUVAL-CHABOUSSOU a souhaité tester un mélange d'huiles essentielles absent de la littérature scientifique mais néanmoins indiqué par un fabricant d'extraits végétaux (Purin d'ortie et Cie). Celui-ci est constitué à un tiers d'HE d'*O. compactum*, et à deux tiers d'HE de *S. aromaticum* pour un dosage de 200ml/ha pour un traitement à 500L/ha, soit 2ml d'huiles essentielles dans 5L pour 100m². Or la surface à traiter pour cette modalité est de 96m² et le volume total de bouillie de 8,5L (5L+ volume mort et amorçage), la cuve du pulvérisateur doit donc contenir 3,4 ml d'huiles essentielles. Ainsi, 1,137 ml d'HE d'*O. compactum* et 2,273ml d'HE de *S. aromaticum* sont dispersées dans un bidon d'un litre d'eau au laboratoire, à l'aide de la même proportion en huile végétale de colza, soit 3,4ml et quelques gouttes de liquide vaisselle (4% du mélange huiles essentielles et huile végétale, soit 0,280ml). Cette technique de dispersion des huiles essentielles dans l'eau est issue des connaissances d'Anne DUVAL-CHABOUSSOU. Néanmoins, une autre méthode de dispersion avec un produit dispersant d'huile essentielle employé en cosmétique, le solubol, a été envisagée et comparée avec la technique d'Anne DUVAL-CHABOUSSOU. La qualité de la dispersion a été évaluée visuellement à la taille des gouttelettes d'huiles juste après agitation dans de l'eau, après un temps d'attente de dix minutes, puis de vingt minutes. Les deux méthodes testées ont donné des résultats satisfaisants et équivalents. Bien qu'ils présentent l'inconvénient de mousser à l'agitation, l'huile végétale et le liquide vaisselle ont été préférés au solubol, dont la composition, inhérente à la marque du produit, contient une huile essentielle de romarin susceptible de fausser les résultats de l'expérimentation au verger.

b-2. Modalités d'application

Type de matériel et d'application

Les traitements sont appliqués par pulvérisation avec un matériel dédié à l'expérimentation : un atomiseur automoteur Yonisos (**Figure 15**). Doté de huit petites cuves d'essai de 15L, d'une cuve de rinçage de 5L et d'une cuve supplémentaire de 80L, cet outil permet de surmonter les contraintes d'un plan d'expérimentation aux modalités morcelées, comme dans le cas d'une randomisation totale, qui imposent de jongler entre les différents produits de traitement d'une parcelle élémentaire à une autre.

Epoque et fréquence des applications

Les traitements de l'expérimentation sont appliqués aux mêmes dates et à la même fréquence que l'ensemble des traitements de nature préventive réalisés à l'encontre de la tavelure primaire du pommier dans les vergers de la Morinière (à l'exception des parcelles plantées en variétés Pink et Rosy glow extrêmement sensibles et pouvant faire l'objet d'un plus grand nombre de traitements). Les traitements

Tableau 5 : Doses et volume de traitement
source : Charlotte BODART, 2018

Modalité	Produit	Forme	Dose	Nombre de blocs	Nombre moyen d'arbres par bloc	Inter-rang (m)	Distance de plantation (m)	Surface à traiter (m ²)	Litrage Hectare (L/ha)	Volume bouillie théorique (L)	Volume bouillie + 15% (L)	Volume bouillie +15% + amorçage (L)	Quantité de produit à appliquer	Quantité de produit à ajouter à la bouillie
T0				4	6	4	1	0	500	0	0	0		
T1	Vivacuire MSD	Solide	0,90 kg/ha	4	6,25	4	1	100	500	5	5,8	8,8	9 g	15,84 g
		Solide	5,00 kg/ha										50 g	88 g
T2	Vivacuire Produit 2	Solide	0,45 kg/ha	4	7,5	4	1	120	500	6	6,9	9,9	5,4 g	8,91 g
		Solide	5,00 kg/ha										60 g	99 g
T3	Vivacuire MSD HE et dispersant	Solide	0,45 kg/ha	4	6	4	1	96	500	4,8	5,5	8,5	4,32 g	7,668 g
		Solide	5,00 kg/ha										48 g	85,2 g
		Liquide	0,42 L/ha										4,0 mL	7 mL
T4	Vivacuire MSD	Solide	0,45 kg/ha	4	6,25	4	1	100	500	5	5,8	8,8	4,5 g	7,875 g
		Solide	5,00 kg/ha										50 g	87,5 g
T5	Vivacuire MSD	Liquide	25,00 L/ha	4	5,75	4	1	92	500	4,6	5,3	8,3	250 mL	440 mL
		Solide	0,45 kg/ha										4,14 g	7,461 g
T6	Vivacuire MSD	Solide	5,00 kg/ha	4	7	4	1	112	500	5,6	6,4	9,4	46 g	82,9 g
		Solide	5,00 kg/ha										230 mL	415 mL
T6	Décoction préle	Liquide	25,00 L/ha	4	7	4	1	112	500	5,6	6,4	9,4	5,04 g	8,496 g
		Liquide	25,00 L/ha										280 mL	470 mL

préventifs préviennent la germination des spores projetées, à l'inverse, les traitements curatifs sont appliqués lorsque les spores projetées sont susceptibles d'avoir déjà germé. Si le verger doit recevoir un fongicide de nature préventive, la parcelle expérimentale n'est pas traitée avec les extraits végétaux, considérés comme ayant une action préventive, mais avec de la bouillie sulfo-calcique (BSC), le produit curatif utilisé dans le verger bio. Le premier traitement peut être déclenché à compter des premières projections d'ascospores, aussitôt que le pommier entre dans un stade physiologique sensible (entre le stade B (gonflement des bourgeons) et le stade C (éclatement des bourgeons) du code de Bagglolini). L'application et la nature d'un traitement est réfléchi en fonction des prévisions de projection d'ascospores fournies par l'outil d'aide à la décision Rimpro développé pour la tavelure, et est arrêtée selon la décision du chef de culture au regard de plusieurs paramètres (faisabilité technique selon les conditions météorologiques, lessivage du traitement antécédent, croissance végétative,...). La campagne de traitement de la tavelure primaire s'achève avec la fin des projections d'ascospores estimée par le modèle de prévision Rimpro et confirmée par le suivi d'un piège Marchi (piège sur lit de feuilles qui permet l'enregistrement horaire des projections de spores). Le **Tableau 6** renseigne l'historique des traitements réalisés dans le cadre de l'expérimentation.

c. Suivi : notations, comptages et mesures

c-1. Epoque et fréquence

Tavelure sur feuilles

Le premier comptage de tavelure sur feuille est déclenché après la sortie des taches issues de la première contamination. Un second comptage de tavelure sur feuille est effectué lors de l'apparition des taches supposées issues des dernières projections d'ascospores. Lorsque la période de contamination est très étendue, des comptages intermédiaires peuvent avoir lieu, cela n'a pas été le cas cette année. Les deux comptages sur feuilles ont respectivement eu lieu le 23/05 et le 26/06. Les parcelles élémentaires de témoins non traités (T0) ont fait l'objet d'un comptage hebdomadaire de sorte à surveiller l'apparition de taches.

Tavelure sur fruits

Le premier et unique contrôle dans les arbres a lieu après l'apparition de taches, il est couplé avec le second et dernier comptage des taches sur feuilles.

c-2. Méthode

Evaluation de la tavelure sur feuilles

L'évaluation porte sur trente pousses, quinze de chaque côté du rang, choisies aléatoirement dans les quatre arbres de chaque parcelle élémentaire (les deux arbres de bordure ne font pas l'objet de notations). Sont relevés dans l'ordre, le nombre de feuilles de rosette tavelées, le nombre total de feuilles de rosette, le nombre de feuilles de pousse de bourse tavelées, le nombre total de feuilles de pousse de bourse.

Evaluation de la tavelure sur fruits

La tavelure sur fruits est évaluée en examinant deux cent pommes dans chaque parcelle élémentaire. De chaque côté du rang, cinquante pommes dans la partie haute et cinquante autres dans la partie basse sont choisies aléatoirement pour être observées. Une classe est attribuée à chaque fruit selon le développement de la tavelure :

Classe 1 : pas d'attaque

Classe 2 : une à trois taches de tavelure

Classe 3 : plus de trois taches

d. Analyse des données

L'analyse des données porte sur l'infestation des feuilles et des fruits, le premier et le second comptage

Tableau 6 : Dates des traitements durant la période couverte par l'essai
 source : Charlotte BODART, 2018

Traitement	Date	Début	Fin	Météo	Vent	Feuillage	Stade
1	26-mars	15h00	17h45	Nuageux	Nul	Sec	C3
2	29-mars	9h45	11h30	Ensoleillé	Léger ouest	Sec	C3
3	03-avr	10h15	11h30	Nuageux	Léger s.ouest	Sec	C3
4	06-avr	09h45	11h10	Ensoleillé	Nul	Sec	C3
5	09-avr	14h15	16h00	Nuageux	Léger est	Sec	D
6	13-avr	9h15	10h45	Ensoleillé	Nul	Sec	D
7	27-avr	9h15	10h30	Ensoleillé	Nul	Sec	G-H
8	30-avr	14h30	14h45	Pluie légère	Nul	Humide	J
9	11-mai	15h20	17h00	Ensoleillé	Léger ouest	Sec	J
10	28-mai	11h50	12h20	Nuageux	Nul	Sec	J
11	30-mai	09h20	11h00	Ensoleillé	Nul	Sec	J

Traitement curatif :	les modalités T1 à T6 ne sont pas traitées avec les produits de l'essai, mais avec de la bouillie sulfocalcique.
----------------------	--

sont traités séparément.

Pour les feuilles, sont traités : le taux de feuilles de rosette tavelées ; le taux de rosettes tavelées ; le taux de feuilles de pousse de bourse tavelées ; le taux de pousses de bourse tavelées ; le taux de feuilles tavelées au total (de rosette et de pousse de bourse) ; le taux de rosettes et de pousses de bourse tavelées au total.

Pour les fruits, sont traitées : la fréquence d'infestation via le taux de fruits tavelés ; l'intensité d'infestation via le calcul d'un indice d'infection au regard des classes 1 à 3 (Indice = Classe 1*0 + Classe 2*1 + Classe3*2).

Ces jeux de données ainsi catégorisés constituent autant de variables à expliquer par le facteur constitué des différentes modalités de traitement. Les données sont dans un premier temps traitées sous Excel afin de calculer, pour chaque variable, le pourcentage d'organes touchés des différentes parcelles élémentaires. Ce dernier subi ensuite une transformation angulaire de la forme $X' = \text{ArcSin}(VX)$ afin de normaliser la distribution de la variable pour l'analyse statistique.

Pour chacune des deux dates de comptage, un histogramme groupé par couple de taux de feuilles/pousses et/ou rosettes tavelées (Rosettes et feuilles de rosette ; Feuilles de pousse de bourse et pousses de bourse ; Feuilles totales et pousses de bourse/rosettes totales) est construit afin de visualiser le pourcentage moyen d'organes tavelés en fonction du traitement appliqué. Le pourcentage moyen de fruits tavelés est également calculé et présenté sous forme d'un histogramme groupé, tandis que l'intensité de l'infestation des fruits est représentée par un histogramme qui donne la répartition des fruits (en %) dans les trois classes d'infestation (sain (1) à plus de trois taches (3)).

L'analyse statistique est effectuée avec le logiciel StatBox. Chaque variable dépendante (ou « variable à expliquer ») est soumise à une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur (traitement), seulement si les postulats de normalité (test des coefficients de Pearson, validé si pour symétrie et aplatissement : p-value > 0,05, seuil $\alpha=5\%$), d'homoscédasticité (test de Bartlett, validé si p-value > 0,05, seuil $\alpha=5\%$) des résidus, et d'indépendance (test de Tukey, validé si p-value > 0,05, seuil $\alpha=5\%$) sont respectés. En cas d'invalidité d'un de ces postulats, un test non paramétrique de Kuskal-Wallis est effectué. L'hypothèse nulle est acceptée si la p-value > 0,05 (seuil $\alpha=5\%$), elle indique que le facteur (traitement) ne permet pas d'expliquer la variabilité de la variable dépendante (taux d'organes tavelés), elle est rejetée si la p-value < 0,05 (ou p-value < 0,10 dans certains cas, lorsque le seuil $\alpha=5\%$ ne permet pas de déceler une différence significative) et montre une influence significative du traitement sur le taux d'organes tavelés. Un rejet de l'hypothèse nulle est suivi d'une analyse statistique de comparaison de moyenne à l'aide d'un Test de Newman-Keuls au seuil $\alpha=5\%$ (ou au seuil $\alpha=10\%$ dans certains cas) qui permet de classer les modalités du facteur en groupes statistiques homogènes.

2. Caractérisation des extraits employés au verger

Le matériel et méthodes de cette partie consiste à expliquer le raisonnement et la démarche qui ont été construits pour cerner la composition chimique des extraits de plantes imposés en début de stage et qui ont fait l'objet de l'expérimentation au verger. A noter que l'étape caractérisation des extraits a débuté avec un travail préliminaire d'initiation à la phytochimie, au moyen de recherches personnelles et à travers une rencontre avec un spécialiste de la chimie des plantes, Denis BELLENOT de l'ITEPMAI. Cette discipline, effectivement incontournable dans le cadre de travaux relatifs aux extraits végétaux, s'intéresse aux substances végétales, à leur structure, leur distribution dans la plante, leurs modifications et les processus de transformation qui se produisent au cours de la vie de la plante, et se penche aussi sur les méthodes d'extraction et d'analyse de celles-ci (Bruneton, 1999).

a. Composition des plantes

Un important travail de recherche bibliographique a été entrepris fin d'établir une liste non exhaustive des principaux métabolites secondaire entrant dans la composition de chaque plante utilisée au verger. Ces informations ont été très largement puisées dans le domaine pharmaceutique, et sont notamment issues de la 3ème édition revue et augmentée de « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales » écrite par le professeur Jean BRUNETON (Bruneton, 1999), et de publications scientifiques en ligne. Les recherches effectuées sur internet, en anglais et en français, ont été guidées par une sélection de

mots clefs-spécifiques, à savoir : l'organe et le nom scientifique (Genre espèce) ou commun de la plante concernée, suivis de termes généraux tels « phytochemistry »/ « phytochimie », « chemical constituents », « chemical compounds »/ « composition chimique », ou ciblant des familles chimiques comme par exemple « phenolic compounds »/ « composés phénoliques ».

b. Identification de composés théoriquement présents dans les extraits, définition de traceurs

La composition chimique non exhaustive de chaque plante ainsi établie, a été analysée à partir des connaissances préalablement acquises en phytochimie, et plus particulièrement à l'aide de l'expertise de Denis BELLENOT, afin de déterminer avec lui quels composés sont susceptibles de se trouver dans l'extrait de chaque plante au regard cette fois du mode d'extraction (solvant, température et durée d'extraction). Ces derniers ont été définis en tant que « traceurs » propres à chaque extrait, à rechercher et à quantifier par la suite. A ce stade l'étude, seul le fait de pouvoir retrouver ces composés dans les extraits a été considéré pour les définir comme traceurs, et non leur potentielle implication dans un effet anti-tavelure.

c. Analyses HPLC des extraits

La société INDENA à Tours et son directeur François MAIREL ont très généreusement procédé à l'analyse par HPLC de chaque extrait testé au verger. L'HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) est une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyses chimiques pour identifier, séparer et doser des composés chimiques dans un mélange (HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression, s.d.). Les extraits sont préparés selon le même mode opératoire que ceux appliqués au verger et déposés à INDENA accompagnés d'un tableau spécifiant pour chacun le ou les composés à rechercher et à doser (les « traceurs » sélectionnés à la section précédente).

C. Résultats

1. Expérimentation au verger

Cette partie est organisée en deux points : le premier expose les choix résultant de l'étude préliminaire des variables qui ont guidé l'analyse statistique des données, le second présente les résultats issus de celle-ci.

a. Etude statistique préliminaire des variables

Pour l'ensemble des variables étudiées les résultats des tests des coefficients de Pearson, de Bartlett et de Tukey au seuil $\alpha=5\%$, ont systématiquement permis, de valider les postulats de normalité, d'homoscédasticité et d'indépendance, avec une p.valeur $> 0,05$. Celles-ci ont ainsi pu être traitées au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur au seuil $\alpha=5\%$. Les ANOVA menées sur les variables issues des données récoltées lors du premier comptage sur feuilles (23/05/2018) et sur fruits (26/06/2018) ont toutes donné, à l'exception de la variable à expliquer « Feuilles de rosette », une p-valeur $< 0,05$, indiquant ainsi une influence significative du traitement sur le taux d'organes tavelés. Ces variables (hormis « Feuilles de rosette ») ont ainsi pu être soumises au test de Newman-Keuls au seuil $\alpha=5\%$. Les ANOVA menées sur les variables issues des données récoltées lors du second comptage sur feuilles (26/06/2018) ont toutes donné une p-valeur $> 0,05$ ne permettant pas d'affirmer une influence significative du traitement sur le taux d'organes tavelés. De fait, ces variables ont été soumises à une seconde série d'ANOVA à un seuil α élargi à 10%. Cela a permis d'observer une influence significative du facteur sur les variables dépendantes « Feuilles de rosette », « Rosettes », « Feuilles toutes », « Pousses et rosettes totales » qui ont ensuite pu être soumises au test de Newman-Keuls au seuil $\alpha=10\%$. (**Tableau 7**)

Tableau 7 : Résultats de l'analyse des données - Expérimentation au verger

source : Charlotte BODART, 2018

		Premier comptage - 23/05/2018			Second comptage - 26/06/2018							
		Newman-Keuls seuil alpha 5%			Newman-Keuls seuil alpha 5%			Newman-Keuls seuil alpha 10%				
Feuilles rosettes	ANOVA	p.value	0,83		ANOVA			p.value	0,093			
	Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène	
	T0	0,023			T0	0,064			T0	0,064	a	
	T1	0,074			T1	0,022			T1	0,022	b	
	T2	0,000			T2	0,000			T2	0,000	c	
	T3	0,030	NS		T3	0,000	NS		T3	0,000	c	
	T4	0,000			T4	0,000			T6	0,000	c	
	T5	0,000			T5	0,000			T5	0,000	c	
T6	0,023			T6	0,000			T4	0,000	c		
Rosettes	ANOVA	p.value	0,005		ANOVA			p.value	0,093			
	Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène	
	T1	0,203	a		T0	0,139			T0	0,139	a	
	T3	0,065	b		T1	0,046			T1	0,046	b	
	T6	0,046	b		T2	0,000			T2	0,000	c	
	T0	0,046	b		T3	0,000	NS		T3	0,000	c	
	T2	0,000	b		T4	0,000			T6	0,000	c	
	T4	0,000	b		T5	0,000			T5	0,000	c	
T5	0,000	b		T6	0,000			T4	0,000	c		
Feuilles pousses de bourse	ANOVA	p.value	0,000		ANOVA			p.value	0,196			
	Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène	
	T0	0,154	a		T0	0,189			T0	0,189		
	T1	0,055	b		T1	0,123			T1	0,123		
	T3	0,023	b		T2	0,089			T2	0,089		
	T2	0,016	b		T3	0,091	NS		T3	0,091	NS	
	T4	0,016	b		T4	0,090			T4	0,090		
	T6	0,000	b		T5	0,085			T5	0,085		
T5	0,000	b		T6	0,069			T6	0,069			
Pousses de bourse	ANOVA	p.value	0,000		ANOVA			p.value	0,149			
	Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène	
	T0	0,412	a		T0	0,442			T0	0,442		
	T1	0,157	b		T1	0,373			T1	0,373		
	T3	0,065	b		T2	0,220			T2	0,220		
	T2	0,046	b		T3	0,207	NS		T3	0,207	NS	
	T4	0,046	b		T4	0,252			T4	0,252		
	T6	0,000	b		T5	0,203			T5	0,203		
T5	0,000	b		T6	0,185			T6	0,185			
Feuilles totales	ANOVA	p.value	0,000		ANOVA			p.value	0,08			
	Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène	
	T0	0,128	a		T0	0,160			T0	0,160	a	
	T1	0,070	b		T1	0,103			T1	0,103	b	
	T3	0,036	bc		T2	0,072			T3	0,074	c	
	T6	0,013	bc		T3	0,074	NS		T4	0,073	d	
	T2	0,013	bc		T4	0,073			T2	0,072	e	
	T4	0,013	bc		T5	0,061			T6	0,061	g	
T5	0,000	c		T6	0,057			T5	0,057	f		
Pousses/ rosettes totales	ANOVA	p.value	0,000		ANOVA			p.value	0,064			
	Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène		Moda	Moyenne	Groupe homogène	
	T0	0,424	a		T0	0,133			T0	0,495	a	
	T1	0,270	b		T1	0,087			T1	0,383	b	
	T3	0,131	bc		T2	0,163			T4	0,252	c	
	T6	0,046	c		T3	0,211	NS		T2	0,220	d	
	T2	0,046	c		T4	0,120			T3	0,207	e	
	T4	0,046	c		T5	0,089			T6	0,203	g	
T5	0,000	c		T6	0,117			T5	0,185	f		
Fruits fréquence					ANOVA			p.value	0,001			
					Moda	Moyenne	Groupe homogène					
					T0	0,399	a					
					T4	0,208	b					
					T1	0,171	b					
					T6	0,163	b					
					T3	0,162	b					
				T2	0,143	b						
				T5	0,129	b						
Fruits intensité					ANOVA			p.value	0,000			
					Moda	Moyenne	Groupe homogène					
					T0	0,714	a					
					T4	0,270	b					
					T1	0,260	b					
					T6	0,226	b					
					T3	0,193	b					
				T5	0,192	b						
				T2	0,143	b						

NS : non significatif

b. Résultats de l'analyse des données

Les résultats de l'analyse statistique sont exprimés à travers la répartition des modalités du traitement en groupes statistiques homogènes identifiés par les lettres « a » et « b », ou par l'absence de significativité notée « NS ». Ceux-ci sont présentés sur les histogrammes qui illustrent, respectivement selon la date de comptage et les organes considérés, le pourcentage d'organes touchés en fonction des modalités de traitement (**Tableau 7** et **Figure 16**).

b-1. Résultats du premier comptage sur feuilles

Feuilles de rosette et rosettes (Figure 16.a)

Les taux de feuilles tavelées par rosette ne sont pas significativement différents au regard du traitement. Les résultats de l'analyse statistique révèlent néanmoins l'existence d'une différence significative entre les taux de rosettes tavelées. La modalité T1 « Référence bio » (groupe a), se distingue effectivement de toutes les autres modalités (groupe b), témoin non traité compris, de manière inattendue avec un taux d'organes touchés plus important.

Feuilles de pousse de bourse et pousses de bourse (Figure 16.b)

Les résultats de l'analyse statistique ont permis de distribuer ces deux variables en deux mêmes groupes statistiques homogènes a et b. Le taux de feuilles de pousse de bourse tavelées et de pousses de bourse tavelées est ainsi significativement plus important dans le témoin non traité T0 (a) que pour toutes les autres modalités de traitement (b). Les traitements composés de cuivre selon la « ½ référence bio » et d'extraits végétaux (T3 à T6) ne se sont pas significativement distingués ni du traitement T2 « ½ référence bio » contenant la même quantité de cuivre, ni du traitement T1 « Référence bio » contenant deux fois plus de cuivre.

Feuilles totales et pousses/rosettes totales (Figure 16.c)

L'analyse statistique des données récoltées sur le taux de feuilles tavelées totales sur rosettes et sur pousses de bourse confondues a abouti à la distinction de trois groupes statistiques homogènes (a, b et c). Le taux de feuilles tavelées est significativement plus important dans le témoin non traité T0 (a) que pour les modalités appartenant aux autres groupes, b et c. Les résultats démarquent clairement le traitement T1 « Référence bio » (b) du traitement T5 « Infusion de clous de girofle, feuilles de sureau et serpolet » (c) au taux de feuilles tavelées plus faible que pour toutes les autres modalités. Les autres modalités de traitement uniquement différentes de T0, elles appartiennent effectivement à la fois aux groupes b et c.

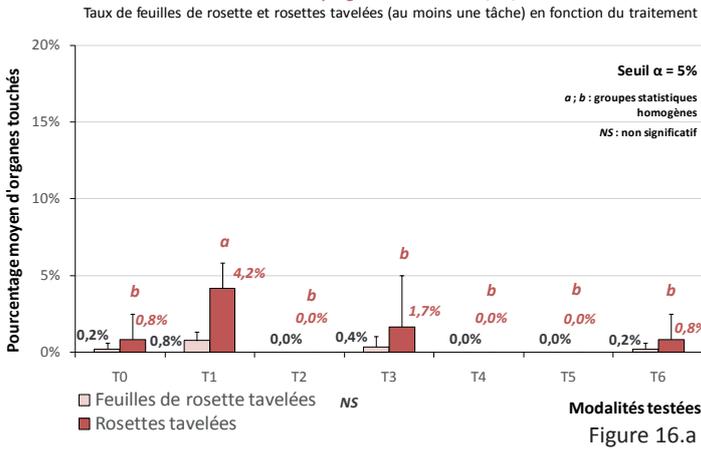
Les résultats de l'analyse statistique des taux rosettes et de pousses de bourse tavelées confondues a également distingué de trois groupes statistiques homogènes (a, b et c). Le taux de feuilles tavelées est significativement plus important dans le témoin non traité T0 (a) que pour les modalités appartenant aux autres groupes, b et c. Les résultats distinguent également le traitement T1 « Référence bio » (b) des traitements T3 à T6 (c) au taux de feuilles tavelées significativement plus faible. Seul le traitement T2 « ½ référence bio » (bc) ne se démarque pas distinctement ni des traitements composés de la même quantité de cuivre et d'extraits végétaux (T3 à T6), ni du traitement contenant une quantité doublement supérieure de cuivre (T1).

b-2. Résultats du second comptage sur feuilles

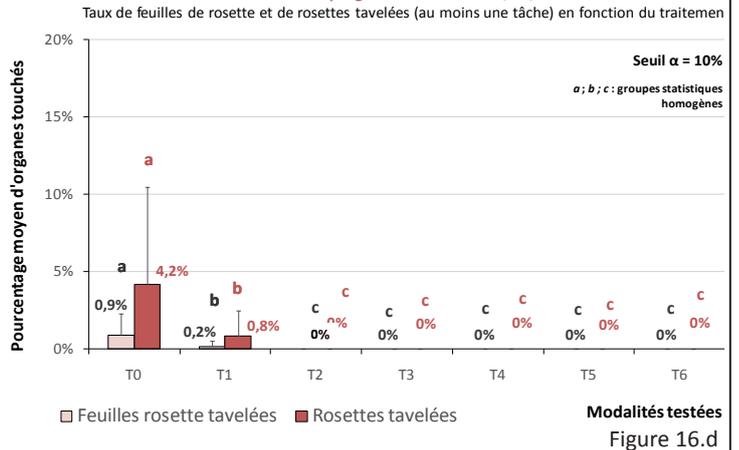
Feuilles de rosette et rosettes (Figure 16.d)

Les résultats issus du second comptage montrent l'apparition d'un troisième groupe statistique homogène. Le traitement T1 « Référence bio » constitue là encore un groupe à part entière (b) en se différenciant significativement du témoin non traité T0 (a) qui présente les taux de feuilles tavelées par rosette et de rosettes tavelées les plus importants, à l'inverse du groupe (c) regroupant toutes les autres modalités du traitement. Ces résultats suivent ceux du premier comptage avec une modalité T1 « Référence bio » (b), traitement contenant le plus de cuivre (en dehors du témoin non traité), qui

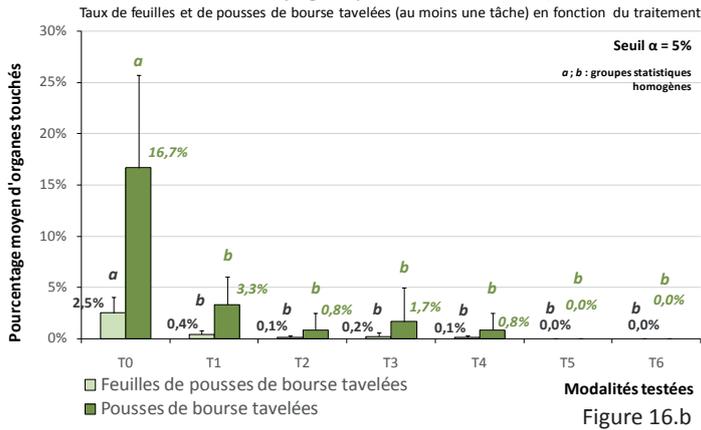
Premier comptage sur rosettes - 23/05/2018



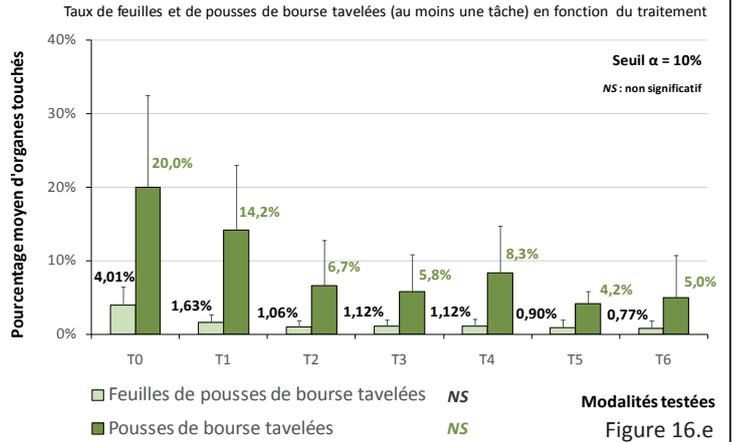
Second comptage sur rosettes - 26/06/2018



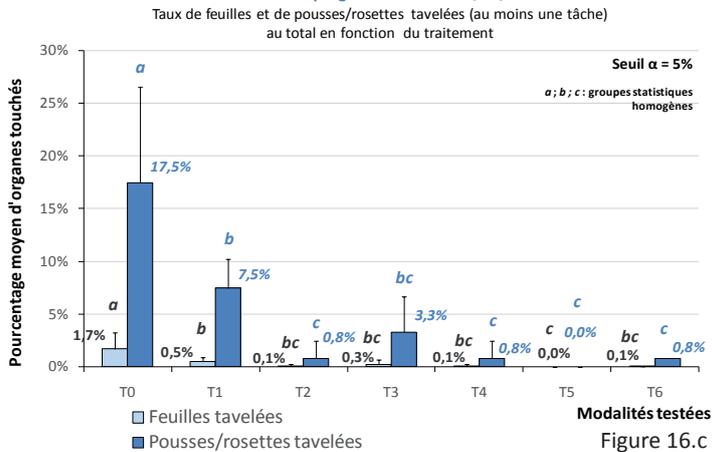
Premier comptage sur pousses de bourse - 23/05/2018



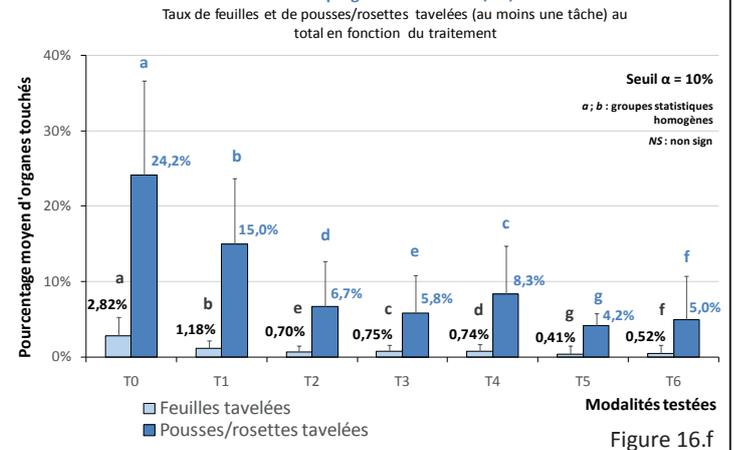
Second comptage sur pousses de bourse - 26/06/2018



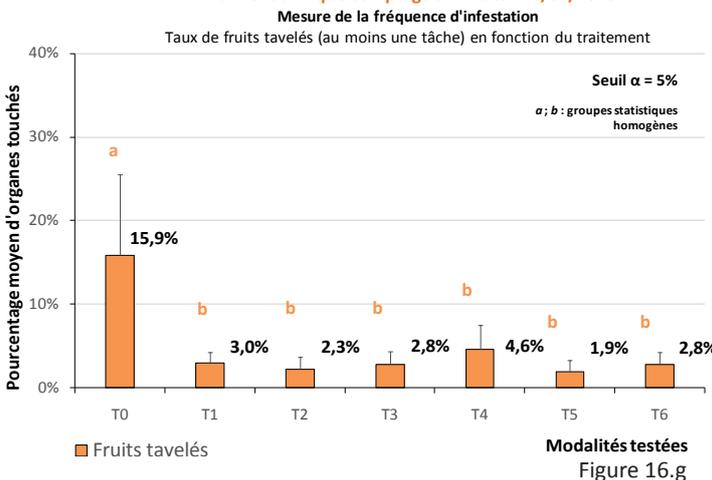
Premier comptage sur feuilles - 23/05/2018



Second comptage sur feuilles - 26/06/2018



Premier et unique comptage sur fruits - 26/06/2018



Premier et unique comptage sur fruits - 26/06/2018

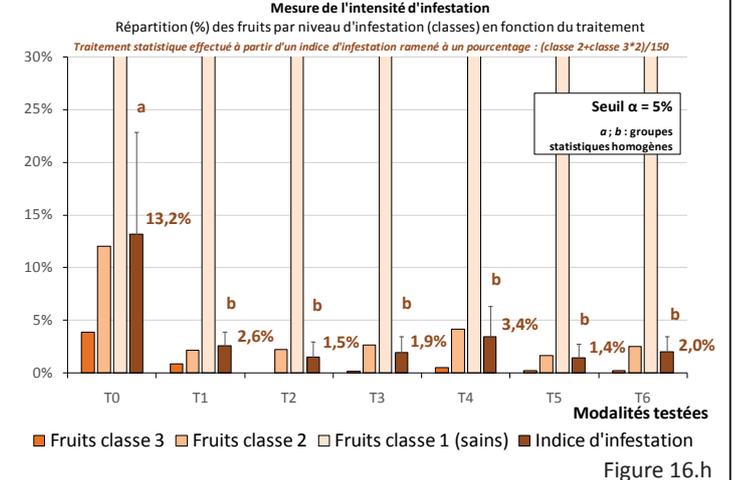


Figure 16 : Résultats - Histogrammes des différents taux d'organes tavelés selon les modalités testées pour les deux comptages
 source : Charlotte BODART, 2018

se distingue des autres modalités (c), traitements contenant la moitié moins de cuivre, par un taux d'organes tavelés significativement supérieur.

Feuilles de pousse de bourse et pousses de bourse (Figure 16.e)

Les taux de feuilles tavelées par pousse de bourse et les taux de pousses de bourse tavelées ne sont pas significativement différents au regard du traitement. Les résultats de l'analyse statistique ne permettent pas de distinguer les modalités de traitement, pas même entre le témoin non traité T0 et les autres modalités.

Feuilles totales et pousses/rosettes totales (Figure 16.f)

Les résultats de l'analyse statistique indiquent que les modalités de traitement sont toutes significativement différentes au regard du taux d'infestation des feuilles et des pousses/rosettes. La lecture graphique de l'histogramme signale néanmoins une tendance : les modalités T5 « Infusion clous de girofle, feuilles de sureau et serpolet » et T6 « Décoction de prêle » semblent observer un taux d'organes tavelés plus faible.

b-3. Résultats sur fruits

Fréquence d'infestation (Figure 16.g)

Les résultats de l'analyse statistique ont permis de déceler deux groupes statistiques homogènes. Le pourcentage de fruits tavelés est ainsi significativement plus important dans le témoin non traité T0 (a) que pour toutes les autres modalités de traitement (b). Les traitements composés de la ½ référence bio et d'extraits végétaux (T3 à T5) ne se sont pas significativement distingués ni du traitement T2 « ½ référence bio » contenant la même quantité de cuivre, ni du traitement T1 « Référence bio » contenant deux fois plus de cuivre.

Intensité d'infestation (Figure 16.h)

Le calcul d'un indice d'infestation des pommes à partir de la répartition de celles-ci en trois classes lors du comptage, a permis de créer une variable quantitative traduisant l'intensité de l'infestation des fruits par la tavelure. L'analyse statistique de cette variable a permis de déceler deux groupes statistiques homogènes. L'intensité de l'infestation est ainsi significativement plus importante dans le témoin non traité T0 (a) que pour toutes les autres modalités de traitement (b). Les traitements composés de la ½ référence bio et d'extraits végétaux (T3 à T5) ne se sont pas significativement distingués ni du traitement T2 « ½ référence bio » contenant la même quantité de cuivre, ni du traitement T1 « Référence bio » contenant deux fois plus de cuivre.

2. Caractérisation des extraits employés au verger

a. Composition des plantes

Un tableau est dressé pour chaque plante. Celui-ci liste les métabolites secondaires cités dans la bibliographie comme entrant dans la composition chimique de l'espèce botanique considérée. Ils sont ordonnés selon leur appartenance à des familles (composés phénoliques, alcaloïdes, terpènes,...) et sous-familles phytochimiques (les composés phénoliques sont par exemple subdivisés en flavonoïdes, acides-phénols, saponosides, coumarines, lignanes, tanins,...), et sont accompagnés, lorsque l'information est disponible, du mode d'extraction ou du solvant utilisé pour les extraire. Ces tableaux sont consultables en annexe (**Annexe 2**), les résultats de ceux-ci exploités dans le cadre de l'étude sont néanmoins donnés dans la section suivant.

b. Identification de composés théoriquement présents dans les extraits, définition de traceurs

Les résultats sont présentés sous forme de tableau (**Tableau 8**) qui donne pour chaque extrait, les composés susceptibles de le constituer au regard de l'espèce botanique et du mode d'extraction

Tableau 8 : Liste non-exhaustive des composés constituant théoriquement les extraits - Définition de traceurs
source : Charlotte BODART, 2018

Décoction de racine d'ortie - <i>Urtica dioica</i>			
Composition phytochimique			Sources
Composés phénoliques	Acides-phénols	acide p-coumarique	Otles et Yalcin, 2012 ; Jan et al 2017
Composés phénoliques	Acides-phénols	acide férulique	Otles et Yalcin, 2012
Composés phénoliques	Flavonoïdes	kaempférol-3-O-ritinoside	Said et al 2015
Composés phénoliques	Coumarines	scopoletine	Said et al 2015, Jan et al 2017
Décoction de prêle des champs - <i>Equisetum arvense</i>			
Composition phytochimique du chimiotype européen			Sources
Composés phénoliques	acides phénols	acide cinnamique	Bruneton 1999
Composés phénoliques	acides phénols	acide dicaféyl-meso-tartique * (marqueur)	Bruneton 1999 ; Sandhu et al, 2010
Composés phénoliques	acides phénols	acide mono-caféoyl-tartarique	Bertrand et Andreu 2013 ; Sandhu et al, 2010
Composés phénoliques	acides phénols	acide 5-O-caféylshikimique	Bruneton 1999 ; Sandhu et al, 2010
Composés phénoliques	acides phénols	acide chlorogénique	Bertrand et Andreu, 2013
Composés phénoliques	flavonoïdes	3-O-(6-O-malonyl-β-D-glucopyranosyl)-quercétol	Bruneton, 1999
Composés phénoliques	flavonoïdes	3-O-glucosyl-quercétol	Bruneton, 1999
Composés phénoliques	flavonoïdes	glycosides de protogekwanine	Bruneton, 1999
Composés phénoliques	flavonoïdes	quercetin 3-O-glucoside	Bertrand et Andreu, 2013 ; Sandhu et al ,2010 ; Mimica-Dukic et al, 2008
Composés phénoliques	flavonoïdes	apigenin 5-O-glucoside	Mimica-Dukic et al, 2008
Composés phénoliques	flavonoïdes	isoquercétine	Mimica-Dukic et al, 2008
Composés phénoliques	glucoside de styrylpyrone	equisetumprone	Sandhu et al, 2010
Composés phénoliques	phenolic petrosin	oniti-9-O-glucoside	Sandhu et al, 2010 ; Asgarpanah et Roohi, 2012 ; Gründemann et al 2014
Terpènes	Triterpènes	saponosides	équisatonine
Alcaloïdes			nicotine
Infusion " 3 plantes"			
Serpolet - <i>Thymus serpyllum</i>			
Composition phytochimique			Sources
Composés phénoliques	Acides phénols	acide caféique	Sonmezdag et al, 2016
Composés phénoliques	Acides phénols	acide rosmarinique	Sonmezdag et al, 2016
Composés phénoliques	Acides phénols	acide férulique	Sonmezdag et al, 2016
Composés phénoliques	Acides phénols	acide chlorogénique	Sonmezdag et al, 2016
Composés phénoliques	Flavonoïdes	luteolin 7-O-glucoside	Sonmezdag et al, 2016
Composés phénoliques	Flavonoïdes	methyl kaempferol O -rutinoside	Sonmezdag et al, 2016
Sureau noir feuilles - <i>Sambucus nigra</i>			
Composition phytochimique			Sources
Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	sambuginine	D'Abrosca et al, 2001 ; Atkinson et Atkinson 2002 ; Inconnu
Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	prunasine	D'Abrosca et al 2001 ; Atkinson et Atkinson 2002 ; Inconnu
Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	holocaline	D'Abrosca et al 2001 ; Atkinson et Atkinson 2002 ; Inconnu
Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	6-acetyl holocaline	D'Abrosca 2001
Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	zierine	Atkinson et Atkinson 2002 ; Inconnu
Dérivés d'acides aminés	Hétéroside phénoliques	acid mandélique	D'Abrosca et al 2001
Dérivés d'acides aminés	Hétéroside phénoliques	icaraside F2	D'Abrosca et al 2001
Composé phénolique	Flavonoïdes	rutine	Inconnu
Composé phénolique	Flavonoïdes	quercetine	Inconnu
Composé phénolique	Flavonoïdes	quercitin 3-glucoside	D'Abrosca et al 2001
Composé phénolique	Flavonoïdes	quercitin 3-O-neo-hesperidoside	D'Abrosca et al 2001
Composé phénolique	Flavonoïdes	kampferol 3-O-neohesperidoside	D'Abrosca et al 2001
Composé phénolique	Flavonoïdes	kampferol 3-glucoside	D'Abrosca et al 2001
Composé phénolique	Flavonoïdes	rhamnetin 3-glucoside	D'Abrosca et al 2001
Clou de girofle - <i>Syzygium aromaticum</i>			
Composition phytochimique			Sources
Composés phénoliques	Acides phénols	acide gallique 0.78g/ 100g	Cortés-Rojas et al, 2014 ; Mittal et al, 2014
Composés phénoliques	Acides phénols	acide caféique	Cortés-Rojas et al, 2014
Composés phénoliques	Acides phénols	acide férulique	Cortés-Rojas et al, 2014
Composés phénoliques	Acides phénols	acide éllagique	Cortés-Rojas et al, 2014
Composés phénoliques	Acides phénols	acide salicylique	Cortés-Rojas et al, 2014
Composés phénoliques	Flavonoïdes	tamarixetin 3-O-b-D-glucopyranoside	Nassar et al, 2007
Composés phénoliques	Flavonoïdes	ombuin 3-O-b-D-glucopyranoside	Nassar et al, 2007
Composés phénoliques	Coumarines	isocoumarines	eugéol 75-88 % ; 9.4 à 14.7g/100g plante fraîche
			Bruneton, 1999 ; Cortés-Rojas et al, 2014 ; Mittal et al, 2014
Traceurs			
			Composés susceptibles de se trouver dans l'extrait

Tableau 9 : Résultats du dosage des traceurs
source : Charlotte BODART, 2018

Extraits végétaux		Traceur	
Nom	Résidu sec (rs) %	Nom	% ramené au rs
Décoction de racine d'ortie	0.90	Scopolétine	RAS
Décoction de prêle	0.93	Isoquercétine	0.21
Infusion " 3 plantes"	1.05	Rutine	0.54

surlignés en rouge clair. Parmi ceux-ci, certains ont été retenus comme « traceurs » selon leur importance quantitative au sein de la plante et la récurrence de leur apparition dans la bibliographie, ils sont surlignés en rouge foncé.

c. Analyses HPLC des extraits

Un tableau (**Tableau 9**) donne le dosage des traceurs recherchés pour chaque extrait, ces informations ont été extraites par les chimistes d'INDENA des chromatogrammes (**Annexe 3**) issus des analyses HPLC réalisées par l'entreprise. A noter qu'au moment des analyses, la société INDENA n'avait pas à sa disposition les références pour détecter certains composés supposés être contenus dans l'infusion « 3 plantes » :

- l'eugénol et l'acide gallique issus de l'infusion du clou de girofle
- la sambuginine issue de l'infusion des feuilles du sureau
- l'acide rosmarinique et la lutéoline issus de l'infusion du serpolet

Seule la rutine a ainsi été recherchée, celle-ci a par ailleurs été détectée et quantifiée.

L'analyse HPLC de la décoction de racine d'ortie n'a pas permis de retrouver de scopolétine dans l'extrait, celle de la décoction de prêle a néanmoins pu détecter et quantifier l'isoquercétine contenue dans l'extrait.

III - ETUDE DES EXTRAITS *IN VITRO* SUR LA GERMINATION DES CONIDIES

A. Objectifs de travail et hypothèses

Ce volet du mémoire s'inscrit dans la continuité des parties qui ont précédé, et consiste à étudier la capacité de différents extraits végétaux à inhiber la germination de conidies de *V. inaequalis in vitro*. Il poursuit un double objectif :

- Permettre de discuter les résultats obtenus au verger en testant exactement les mêmes produits sur la germination des conidies au laboratoire. Le but recherché étant de pouvoir comparer à la fois les résultats *in vitro* entre eux, mais surtout avec ceux obtenus *in vivo*, afin d'en discuter les similitudes ou les écarts, et potentiellement en déduire des hypothèses quant au mode d'action des extraits végétaux.
- Tester d'autres extraits végétaux, sélectionnés à partir de métabolites secondaires, de plantes ou directement d'extraits identifiés dans la synthèse bibliographique comme pouvant présenter une activité antifongique vis-à-vis de *V. inaequalis* ; et discuter leur activité phytosanitaire au regard des résultats observés, et de leur composition chimique. L'objectif étant d'identifier parmi eux des extraits dont le potentiel mériterait d'être approfondi à l'occasion d'études ultérieures.

Les hypothèses de travail suivantes ont été considérées pour les tests de germination :

- L'efficacité des traitements cupriques est corrélée positivement à la quantité de cuivre métal qui est appliquée.
- L'appartenance à différentes souches de *V. inaequalis* des conidies récoltées dans le verger pour effectuer les tests de germination n'a pas été prise en compte dans la mesure où ces dernières n'ont pas toujours pu être prélevées sur la même variété de pommiers et n'ont pas pu faire l'objet d'une identification.
- Qu'ils soient biocides ou impliqués dans des mécanismes de défense du pommier, ce sont les métabolites secondaires des plantes qui expliquent l'effet des extraits végétaux à l'encontre de la tavelure.

B. Matériel et méthodes

L'exposition du matériel et des méthodes employés pour l'étude des extraits végétaux *in vitro* est organisée en deux temps : les tests de germination menés en laboratoire, suivis du travail de caractérisation des extraits.

1. Tests de germination en laboratoire

Une expérimentation conduite dans les locaux de la Morinière, a été à l'origine des tests de germination exposés ci-dessous. Une autre a été réalisée à l'INRA d'Angers par des membres de l'équipe ResPom avec du matériel et une méthode particulièrement performante et adaptée, elle a consisté en une analyse de la cinétique de croissance de *V. inaequalis* en microplaque par néphélométrie. Celle-ci a malheureusement échoué et ne sera pas abordée ici, elle est néanmoins disponible en annexe (**Annexe 1**).

a. Choix et préparation des extraits végétaux

Produits de référence et produits à étudier

Plusieurs séries de tests de germination ont été réalisées en vue de répondre aux objectifs exposés précédemment (**Tableau 10**).

- La **première série** a ainsi très exactement repris les produits de référence, le témoin non traité, et les produits expérimentés au verger pour en tester les propriétés anti-germinatives sur conidies *in vitro*. Elle cherche à répondre au premier objectif cité ci-dessus.

Les trois séries qui ont suivi tendent à répondre au second objectif et n'ont ainsi pas repris les modalités du verger. Les extraits ont été testés seuls et non de paire avec la « ½ référence bio » (cuivre 0,45kg/ha et soufre à 5kg/ha), avec un témoin non traité et la « Référence bio » (cuivre à 0,90kg/ha et soufre

Tableau 10 : Séries de tests de germination

source : Charlotte BODART, 2018

Série	Modalité	Produit	Date
1	T0	Témoin non traité	18-juil
	T1	Référence bio	
	T2	1/2 réf bio	
	T3	1/2 réf bio + HE origan + HE clou de girofle+ dispersant	
	T4	1/2 réf bio + décoction racine d'ortie	
	T5	1/2 réf bio + infusion 3 plantes	
	T6	1/2 réf bio + décoction prêle	
2	T0	Témoin non traité	19-juil
	T1	Référence bio	
	T2	Infusion clou de girofle, feuilles de sureau, serpolet	
	T3	Infusion clou de girofle	
	T4	Infusion feuilles de sureau	
	T5	Infusion serpolet	
3	T0	Témoin non traité	20-juil
	T1	Référence bio	
	T2	Infusion saponaire	
	T3	Infusion feuilles de lierre	
	T4	Infusion feuilles de bouleau	
	T5	Macérat alcoolique bourgeons de peuplier	
4	T0	Témoin non traité	24-juil
	T1	Référence bio	
	T2	Infusion écorce de chêne	
	T3	Extrait écorce de chêne	
	T4	Extrait pépins de raisin	
	T5	Extrait thé vert	
	T6	Extrait écorce chêne, pépins de raisin	



Figure 17 : Récolte de feuilles tavelées dans le verger piège

source : la Morinière, 18/07/2018

à 5kg/ha), comme unique produit de référence, pour faire ressortir au mieux d'éventuelles différences entre les traitements.

- La **deuxième série** s'est intéressée à plusieurs extraits de plantes identifiées à l'occasion d'échanges avec des professionnels et de recherches bibliographiques. Ont été retenus, une infusion de saponaire *Saponaria officinalis*, une infusion de feuilles de lierre *Hedera helix*, une infusion de feuilles de bouleau *Betula pubescens* (préparées selon le même mode opératoire), et un macérât alcoolique de bourgeons de peuplier *Populus nigra* acheté dans le commerce.

- La **troisième série** de tests s'est focalisée sur l'extrait qui, suite aux observations dans le verger et à la tendance décelée dans les premiers tests de germination, a montré, à première vue, le plus d'intérêt. L'infusion des trois plantes, clous de girofle, feuilles de sureau, serpolet, a ainsi fait l'objet de nouveaux tests de germination. L'effet anti-germinatif des clous de girofle, des feuilles de sureau et du serpolet, infusés seuls, et celui de l'extrait issu de l'infusion du mélange des trois plantes ont été comparés.

- La **quatrième** et dernière **série** a également été consacrée à des extraits d'autres plantes afin d'en étudier le potentiel anti-germinatif sur les conidies de *V. inaequalis*. Les produits ont gracieusement été fournis par la société INDENA sous forme d'extraits secs déjà formulés. Parmi eux, un extrait de thé vert *Camelia sinensis*, un extrait d'écorces de chêne *Quercus robur*, et un extrait de pépins de raisin *Vitis vinifera*. Les extraits d'écorces de chêne et de pépins de raisin ont été testés ensemble et séparément.

Fabrication des extraits (Tableau 11)

Les extraits de la série 1 (décoction de racine d'ortie, décoction de prêle, infusion « trois plantes : clous de girofle, feuilles de sureau, serpolet ») ont été élaborés selon le même mode opératoire que ceux préparés pour le verger. (**Figure 19**)

Toutes les infusions de plantes (clous de girofle seuls, feuilles de sureau seules, serpolet seul, saponaire, lierre, bouleau) et la macération d'écorce de chêne ont été fabriquées, comme les autres extraits, à raison de 50g de plante sèche par litre d'eau. Les infusions ont été montées à une température 90°C et l'écorce de chêne a macéré durant trois jours.

Les autres produits (huiles essentielles, extraits secs d'INDENA, macérât de bourgeons de peuplier) n'ont pas fait l'objet d'une fabrication à la Morinière et ont été achetés ou donnés prêts à l'emploi.

b. Réalisation des tests de germination

Les tests de germination ont consisté à mettre 1ml de chaque produit à étudier en contact avec 1ml d'une suspension de conidies de *V. inaequalis* dans des pots en plastique (40ml) à raison de quatre répétitions par modalité.

Préparation des produits de chaque modalité

Les produits (dosage, dilution et mélanges selon la modalité) testés pour chaque série sont indiqués dans le **Tableau 12**.

Pour la série 2 à 3, le témoin non traité et la modalité « Référence bio » ont été préparés de la même manière que pour la première série de tests en diluant préalablement le cuivre et le soufre aux doses souhaitées (**Figure 18**). Toutes les infusions sont testées pures et non diluées, les extraits secs d'INDENA sont dilués à la concentration de 5g par litre d'eau conseillée par le fabricant, le macérât de bourgeon de peuplier à 22% a été dilué dans de l'eau de sorte que la quantité de plante utilisée soit de 50g pour 1kg de solvant (la masse volumique de l'alcool étant différente de celle de l'eau), soit 1ml de macérât mélangé à 3,4ml d'eau. Pour ce dosage, il a été considéré que les bourgeons de peuplier ont été extraits à partir de plante sèche.

Matériel biologique : obtention d'une suspension de conidies

Le pouvoir anti-germinatif des différents produits est testé sur des suspensions de conidies de *V. inaequalis*. Pour chacune des quatre séries de tests, une suspension de conidies a été préparée comme suit :

- Des feuilles tavelées sont récoltées dans le verger sur des arbres n'ayant reçu aucun traitement de nature fongicide pouvant altérer le taux de germination initial des spores (**Figure 17**). Les feuilles tavelées ont ainsi été prélevées dans le « verger piège » de la Morinière (une zone à l'extrémité d'une parcelle plantée

Tableau 11 : Extraits végétaux testés par chaque série
source : Charlotte BODART, 2018

Série	Modalité	Nom de l'extrait	Plante			Solvant		Extraction			
			Espèce botanique	Partie utilisée	Etat	g/L de solvant	Nature	pH	Type	Température	Durée
S1T4		Huiles essentielles	<i>Origanum compactum</i>	non renseigné	non renseigné			Extrait formulé, distillation par entraînement à la vapeur			
S1T5		Décoction racine d'ortie	<i>Syzygium aromaticum</i>	boutons floraux	non renseigné			Extrait formulé, distillation par entraînement à la vapeur			
S1T6	S2T3		<i>Urtica dioica</i>	racines	sec	50	neutre	décoction	90-95°C	30 minutes	
S2T3		Infusion "trois plantes"	<i>Sambucus nigra</i>	feuilles	sec	16,7	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S1T7		Décoction prêle	<i>Thymus serpyllum</i>	boutons floraux	sec	16,7	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S2T4		Infusion clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	parties aériennes	sec	50	neutre	décoction	90-95°C	30 minutes	
S2T5		Infusion feuilles de sureau	<i>Syzygium aromaticum</i>	boutons floraux	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S2T6		Infusion serpolet	<i>Sambucus nigra</i>	feuilles	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S3T3		Infusion saponaire	<i>Thymus serpyllum</i>	feuilles, fleurs	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S3T4		Infusion lierre	<i>Saponaria officinalis</i>	parties aériennes	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S3T5		Infusion bouleau	<i>Hedera helix</i>	feuilles	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S3T6		Macération peuplier	<i>Betula sp.</i>	feuilles	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	
S4T3		Extrait thé vert	<i>Populus nigra</i>	bourgeons	frais			Extrait formulé, sous forme liquide à 22% de bourgeons de peuplier			
S4T5		Extrait écorce chêne	<i>Camelia sinensis</i>	feuilles	sec			Extrait sec formulé, sous forme de poudre			
S4T6		Extrait pépins raisin	<i>Quercus sp.</i>	écorce	sec			Extrait sec formulé, sous forme de poudre			
S4T7		Macération écorces chêne	<i>Vitis vinifera</i>	pépins	sec			Extrait sec formulé, sous forme de poudre			
			<i>Quercus sp.</i>	écorces	sec	50	neutre	infusion	90°C	3 à 5 secondes	

Tableau 12 : Produits testés pour chaque série de test
source : Charlotte BODART, 2018

Série	Modalité	Produit	Forme	Dose
S1	T0	Eau	liquide	1 ml
	T1	Vivacuire	solide	3,6 mg
		MSD	solide	20 mg
		Eau	liquide	1 ml
	T2	Infusion trois plantes	liquide	1 ml
T3	Infusion clou de girofle	liquide	1 ml	
T4	Infusion sureau	liquide	1 ml	
T5	Infusion serpolet	liquide	1 ml	
S2	T0	eau	liquide	1 ml
	T1	Vivacuire	solide	3,6 mg
		MSD	solide	20 mg
		Eau	liquide	1 ml
	T2	Infusion saponaire	liquide	1 ml
T3	Infusion lierre	liquide	1 ml	
T4	Infusion bouleau	liquide	1 ml	
T5	Macérât peuplier	liquide	1 ml	
S3	T0	eau	liquide	1 ml
	T1	Vivacuire	solide	3,6 mg
		MSD	solide	20 mg
		Eau	liquide	1 ml
	T2	Vivacuire	solide	1,8 mg
		MSD	solide	20 mg
		Eau	liquide	1 ml
	T3	Vivacuire	solide	1,8 mg
		MSD	solide	20 mg
		Eau	liquide	0,9 ml
	HE et dispersant	liquide	0,004 ml	
T4	Vivacuire	solide	1,8 mg	
	MSD	solide	20 mg	
	Eau	liquide	0,9 ml	
	Décoction racine ortie	liquide	0,1 ml	
T5	Vivacuire	solide	1,8 mg	
	MSD	solide	20 mg	
	Eau	liquide	0,9 ml	
	Infusion "3 plantes"	liquide	0,1 ml	
T6	Vivacuire	solide	1,8 mg	
	MSD	solide	20 mg	
	eau	liquide	0,9 ml	
	Décoction prêle	liquide	0,1 ml	
S4	T0	Eau	liquide	1 ml
	T1	Vivacuire	solide	3,6 mg
		MSD	solide	20 mg
		Eau	liquide	1 ml
	T2	Extrait thé vert	solide	5 mg
T3	Extrait chêne	solide	5 mg	
T4	Extrait pépins raisin	solide	5 mg	
T5	Extrait chêne	solide	2,5 mg	
	Extrait pépins raisin	solide	2,5 mg	

d'une cinquantaine de pommiers de différentes variétés, résistantes et sensibles, destinée à surveiller l'apparition de nouvelles souches de *V. inaequalis* capables de contourner la résistance de certaines variétés à la tavelure), sur des pommiers sensibles appartenant à la variété Granny, Golden ou Gala. Les feuilles doivent être de préférence récoltées au printemps, avant que les chaleurs de l'été n'assèchent les taches et ne ralentissent l'activité du champignon. Dans le cas présent, les premières taches de tavelure se sont manifestées tardivement dans la saison et ont retardé les tests de germinations et la récolte des feuilles au mois de juillet. Une suspension d'une cinquantaine de ml est nécessaire pour un test de germination de six à sept modalités à quatre répétitions, à raison de 1ml de suspension par unité expérimentale. Une quarantaine de feuilles, si possible porteuses de plusieurs taches de tavelure non desséchées, a été estimée, à force de plusieurs essais pour préparer la suspension de spores, nécessaire afin d'assurer une suspension d'une cinquantaine de ml suffisamment concentrée en conidies.

- Afin de maximiser la concentration en spores, les taches sont découpées à partir des feuilles dans un flacon en verre (capacité 125ml) dans lequel sont ensuite versés 50ml d'eau (**Figure 21**).

- La suspension de conidies est ensuite obtenue par lavage des taches en agitant énergiquement le flacon pendant dix minutes. Le système qualité de la « Procédure de production d'inoculum et d'inoculation artificielle » de *V. inaequalis* rédigé par le Ctifl précise qu'« une agitation énergique et courte est préférée à une agitation lente sur agitateur rotatif. En effet cette dernière opération favorise l'excrétion de tanins qui freinent la germination des spores ».

- L'étape finale avant utilisation consiste à filtrer la suspension sur une grille avec des mailles suffisamment écartées (de type chinois) de sorte à enlever les morceaux de feuilles, qui pourraient boucher la pipette, sans retenir les conidies.

Préparation des unités expérimentales (Figure 20)

Avant d'être remplis en fin de journée, les pots en plastique sont ordonnés, horizontalement du témoin non traité à gauche (modalité T0) à la dernière modalité à droite, et verticalement de la première répétition « a » en haut à la quatrième répétition « d » en bas. Les produits sont pipetés et placés dans les pots en amont de l'étape de mise en suspension des conidies des taches découpées sur les feuilles tavelées, de sorte que celles-ci ne puissent commencer à germer avant d'être en contact avec les traitements. Un ml de chaque produit est ainsi placé à l'aide d'une micropipette de la répétition « a » à la répétition « d » de la première modalité avant de passer à la modalité suivante (soit verticalement de gauche à droite). Un ml de la suspension de conidies filtrée est ensuite ajouté à chaque pot passant par chaque modalité de la première répétition avant de passer à la répétition suivante (soit horizontalement de haut en bas) à éviter de créer des différences liées à la méthode et indépendantes des produits entre les modalités. Les pots sont refermés, légèrement agités un à un afin de mélanger leur contenu qui est laissé à germer toute la nuit dans l'optique d'obtenir le plus haut taux de germination possible dans le témoin non traité.

c. Suivi : notations, comptages et mesures

Les notations sont réalisées par observation au microscope (grossissement x200) entre lame et lamelle d'une goutte de chaque unité expérimentale. L'effet anti-germinatif des produits est mesuré au nombre de conidies germées compté sur les cent premières observées par lamelle, quatre-cent conidies par modalité sont ainsi observées. L'ensemble des modalités d'une répétition est traité avant de passer à la répétition suivante, trois unités expérimentales peuvent être notées par lame, un court laps de temps doit s'écouler entre la préparation (dépôt de la goutte et de la lamelle) et l'observation de celles-ci, sans quoi, la goutte sèche est devenue inexploitable. Une planche dans le laboratoire de la Morinière permet d'identifier les conidies *V. inaequalis* parmi une sélection de spores de champignon principalement au cœur de problématiques de conservation des pommes.

d. Analyse des données

Pour chacune des quatre séries de tests de germination, l'analyse des données porte sur le taux de germination d'un total de quatre-cent conidies (cent par répétition) au regard des produits testés



Figure 18 : Préparation du mélange cuivre et soufre de la «Référence bio»
 source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018



Figure 19 : Extraits végétaux prêts à l'emploi
 source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018

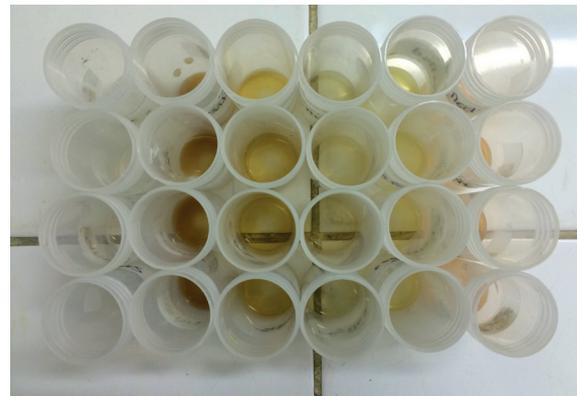


Figure 20 : Préparation des unités expérimentales
 source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018



Figure 21 : Découpe des taches de tavelure pour préparer la suspension de spores
 source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018

(modalités du facteur traitement).

Les données sont dans un premier temps traitées sous Excel afin d'afficher, pour chaque série de tests, le pourcentage de spores germées par unité expérimentales et de lui appliquer une transformation angulaire de la forme $X' = \text{ArcSin}(\sqrt{X})$, et une transformation logarithmique de la forme $X' = \log(X)$, en vue de normaliser la distribution de la variable. La transformation des données la plus satisfaisante est retenue pour l'analyse statistique. Une analyse graphique est effectuée avec la construction d'un histogramme groupé par série permettant de visualiser le pourcentage de germination moyen des conidies en fonction du traitement.

L'analyse statistique est effectuée à l'aide du programme R x64 3.4.2. et du package « agricolae ». Chaque variable dépendante (ou « variable à expliquer ») est soumise à une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur (traitement), seulement si les postulats de normalité (test de normalité de Shapiro-Wilk, validé si $p\text{-value} > 0,05$, seuil $\alpha=5\%$), d'homoscédasticité (test de Bartlett, validé si $p\text{-value} > 0,05$, seuil $\alpha=5\%$) des résidus, et d'indépendance (test Tukey, validé si $p\text{-value} > 0,05$, seuil $\alpha=5\%$) sont respectés. L'hypothèse nulle est acceptée si la $p\text{-value} > 0,05$ (seuil $\alpha=5\%$), elle indique que le facteur (traitement) ne permet pas d'expliquer la variabilité de la variable dépendante (taux de germination des conidies), elle est rejetée si la $p\text{-value} < 0,05$ (ou $p\text{-value} < 0,10$ dans certains cas) et montre une influence significative du traitement sur le taux de germination des conidies. Un rejet de l'hypothèse nulle est suivi d'une analyse statistique de comparaison de moyenne à l'aide d'un Test de Newman-Keuls au seuil $\alpha=5\%$ (ou au seuil $\alpha=10\%$ dans certains cas) qui permet de classer les modalités du facteur en groupes statistiques homogènes. Lorsque l'un de ces postulats n'est pas vérifié, un test non paramétrique de Kuskal-Wallis est effectué, si la $p\text{-value}$ est significative ($p\text{-value} < 0,05$ ou $p\text{-value} < 0,10$ dans certains cas), un test pairwise.wilcoxon au seuil $\alpha=5\%$ ou $\alpha=10\%$ permet de comparer les moyennes deux-à-deux et de dégager des groupes statistiques homogènes.

2. Caractérisation des extraits employés au laboratoire

Le matériel et méthodes de cette partie détaille le raisonnement et la démarche élaborés pour cerner la composition chimique des extraits de plantes utilisés uniquement au laboratoire. Un premier point se penche sur la composition des infusions fabriquées à la Morinière à partir de plantes sèches, tandis qu'un second s'intéresse à celle des extraits secs fournis par la société INDENA. La caractérisation de ces extraits ne s'est pas voulue aussi poussée que la précédente, il s'agit d'un travail de surface qui a simplement cherché à déterminer assez grossièrement la composition des extraits afin de la confronter aux résultats des tests de germination, et à ceux de la synthèse bibliographique (identification de métabolites secondaires d'intérêt potentiel dans la lutte contre la tavelure).

a. Identification de composés théoriquement présents dans les infusions et le macérât de peuplier

Les principales molécules végétales constitutives des infusions des diverses plantes sèches utilisées pour les tests de germination ont été déterminées selon la même méthodologie que dans le cas de la caractérisation des extraits du verger (recherche des composés présents dans la plante, suivie de ceux présents dans l'extrait au regard de son mode préparatoire) composition de la plante. Les extraits n'ont néanmoins pas fait l'objet d'une analyse chimique, la présence et la quantification des composés n'ont pu être vérifiées ni établies.

b. Composition des extraits secs d'INDENA

Les extraits secs fournis par la société INDENA sont des produits industriels méticuleusement préparés afin de remplir des critères de qualité et d'homogénéité. Chaque extrait fabriqué par l'entreprise est ainsi dosé en composés « traceurs » qui lui sont propres, il s'agit d'une information tant qualitative que quantitative qui permet de s'assurer de la constitution du produit. La composition et le dosage par analyse HPLC des lots d'extrait sec d'écorce chêne, de pépins de raisin, et de thé vert ont ainsi été transmis par INDENA.

Tableau 13 : Résultats de l'analyse des données - Expérimentation au laboratoire
source : Charlotte BODART, 2018

	Avec le témoin non traité T0			Sans le témoin non traité T0		
Série 1 18.07	Transformation : log			Transformation : log		
	Shapiro	p.value	0.0006717	Shapiro	p.value	8.064e-06
	Bartlett	p.value	0.006693;0.02773	Bartlett	p.value	0.008607;6.752e-05
	Kruskal-Wallis	p.value	0.02902	Kruskal-Wallis	p.value	0.4076
	Pairwise Wilcoxon - seuil alpha 5%					
	Modalité	Moyenne	Groupe homogène	Modalité	Moyenne	Groupe homogène
	T0	0,37	a	T4	0,168	
T4	0,17	b	T1	0,160	NS	
T1	0,16	b	T3	0,150		
T3	0,15	b	T2	0,125		
T2	0,13	b	T5	0,118		
T5	0,12	b				
Série 2 19.07	Transformation : log			Transformation : log		
	Shapiro	p.value	0.2364	Shapiro	p.value	0.2041
	Bartlett	p.value	0.2075;0.8988	Bartlett	p.value	0.1942;0.8902
	Anova	p.value	0.0001977	Anova	p.value	0.1135
	Newman-Keuls - seuil alpha 5%					
	Modalité	Moyenne	Groupe homogène	Modalité	Moyenne	Groupe homogène
	T0	0,31	a	T2	0,130	
T2	0,13	b	T3	0,103	NS	
T3	0,10	b	T1	0,083		
T1	0,08	b	T5	0,070		
T5	0,07	b	T4	0,065		
T4	0,07	b				
Série 3 20.07	Transformation : log			Transformation : log		
	Shapiro	p.value	0.07625	Shapiro	p.value	0.2411
	Bartlett	p.value	0.4153;0.8217	Bartlett	p.value	0.3395;0.7916
	Anova	p.value	6.643e-06	Anova	p.value	0.07781
	Newman-Keuls - seuil alpha 5%			Newman-Keuls - seuil alpha 10%		
	Modalité	Moyenne	Groupe homogène	Modalité	Moyenne	Groupe homogène
	T0	0,425	a	T2	0,198	
T2	0,198	b	T4	0,185		
T4	0,185	b	T1	0,170	NS	
T1	0,170	b	T5	0,153		
T5	0,153	b	T6	0,130		
T6	0,130	b	T3	0,125		
T3	0,125	b				
Série 4 24.07	Transformation : log			Transformation : log		
	Shapiro	p.value	0.00101	Shapiro	p.value	0.2686
	Kruskal-Wallis	p.value	0.09823	Bartlett	p.value	0.6127;0.2472
	Pairwise Wilcoxon - seuil alpha 10%			Anova		
				p.value		
				0.9852		
	Modalité	Moyenne	Groupe homogène	Modalité	Moyenne	Groupe homogène
T0	0,413	a	T4	0,148		
T4	0,148	b	T2	0,140		
T2	0,140	b	T6	0,138	NS	
T6	0,138	b	T3	0,135		
T3	0,135	b	T1	0,130		
T1	0,130	b	T5	0,130		
T5	0,130	b				



Figure 22 : Conidies de *V. inaequalis* non germées (x200)
source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018

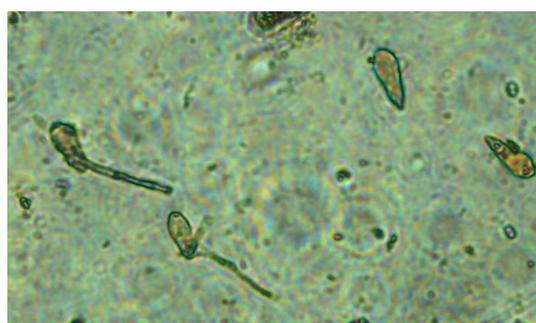


Figure 23 : Conidies de *V. inaequalis* germées (gauche) et non germées à (droite) (x200)
source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018

C. Résultats

1. Tests de germination en laboratoire

Cette partie est organisée en deux points : le premier expose les choix résultant de l'étude préliminaire des variables qui ont guidé l'analyse statistique des données, le second présente les résultats issus de celle-ci.

a. Etude statistique préliminaire des variables

La transformation angulaire des données n'a pas permis de normaliser la distribution des variables, la transformation logarithmique, plus satisfaisante, lui a donc été préférée.

Les résultats des tests des coefficients de Shapiro-Wilk, de Bartlett et de Tukey au seuil $\alpha=5\%$, n'ont pas systématiquement permis, de valider les postulats de normalité, d'homoscédasticité et d'indépendance. Seules les données de la série 2 et de la série 3 ont pu être traitées au moyen d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur au seuil $\alpha=5\%$. L'obtention d'une p-value $< 0,05$, indiquant une influence significative du traitement sur la germination des conidies, a permis de poursuivre l'analyse avec un test de Newman-Keuls au seuil $\alpha=5\%$. Dans le cas de la série 1, le postulat d'homoscédasticité n'a pu être validé, un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis s'est donc substitué à l'ANOVA. L'observation d'une p-value $< 0,05$ significative a entraîné l'application d'un test Pairwise Wilcoxon au seuil $\alpha=5\%$. Le test de Shapiro-Wilk appliqué aux données de la série 4 a rejeté l'hypothèse nulle selon laquelle la variable à expliquer est normalement distribuée, celle-ci a ainsi été traitée avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. L'obtention d'une p-value = 0,098 a amené à continuer l'analyse via un test Pairwise Wilcoxon avec un seuil α étendu à 10% dans l'optique d'observer, malgré une p.value $> 0,05$, une différence significative liée au traitement entre les valeurs de la variable à expliquer.

b. Résultats de l'analyse des données (Tableau 13)

Les résultats de l'analyse statistique sont exprimés à travers la répartition des modalités du traitement en groupes statistiques homogènes identifiés par des lettres en minuscules, ou par l'absence de significativité notée « NS ». Ceux-ci sont présentés sur les histogrammes qui illustrent, respectivement, le pourcentage de conidies germées en fonction du traitement, de chaque série de tests de germination (**Figure 24**).

Pour les quatre séries de tests de germination les résultats de l'analyse statistique ont à chaque fois uniquement permis de déceler deux groupes statistiques homogènes, le premier étant composé du témoin non traité seul (a), le second de toute les autres modalités de traitement (b). Au sein d'une même série, le taux de germination des conidies s'avère être significativement plus important pour le témoin non traité T0 (a), qu'avec toutes les autres modalités de traitement (b), traitements cupriques « Référence bio », « ½ référence bio » et extraits végétaux confondus.

Dans le cas de la série 3 les traitements composés de la ½ référence bio et d'extraits végétaux (T3 à T6) ne se sont pas significativement distingués ni du traitement T2 « ½ référence bio » contenant la même quantité de cuivre, ni du traitement T1 « Référence bio » contenant deux fois plus de cuivre (**Figure 24.c**). Il en va de même dans le cas des séries 1,2 et 4 où les différentes modalités « extraits végétaux » ne sont pas distinguées de l'unique traitement contenant du cuivre, la modalité T1 « ½ référence bio » (**Figure 24.a ; 24.b ; 24.d**).

Ces résultats n'ont pas permis d'observer une différence significative sur la germination des conidies entre le traitement à base de cuivre et les extraits végétaux. Les analyses statistiques ont donc été reconduites avec la même démarche mais en supprimant la modalité T0 (témoin non traité) du jeu de données, dans l'éventualité de faire apparaître une différence significative entre le témoin T1 à base de cuivre, « Référence bio » pour la série 3 ou « ½ référence bio » pour les séries 1,2 et 4, et les autres modalités de traitement correspondant aux différents extraits végétaux. Pour l'ensemble, les résultats sont néanmoins restés non-significatifs, ne permettant pas d'affirmer une différence entre les témoins à base de cuivre et les extraits végétaux sur la germination des conidies *in vitro*.

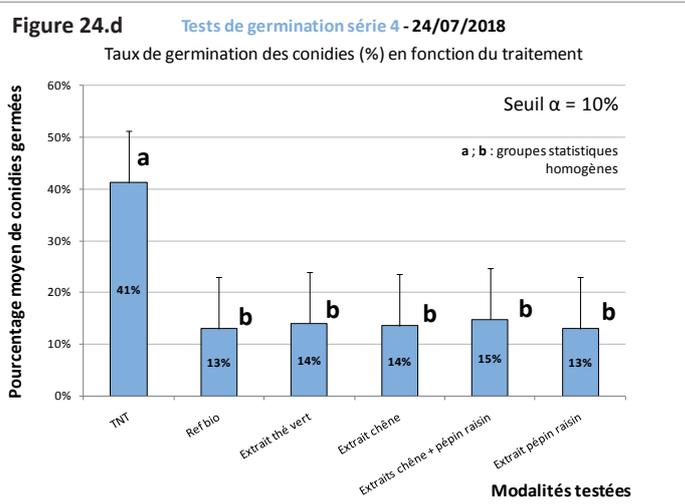
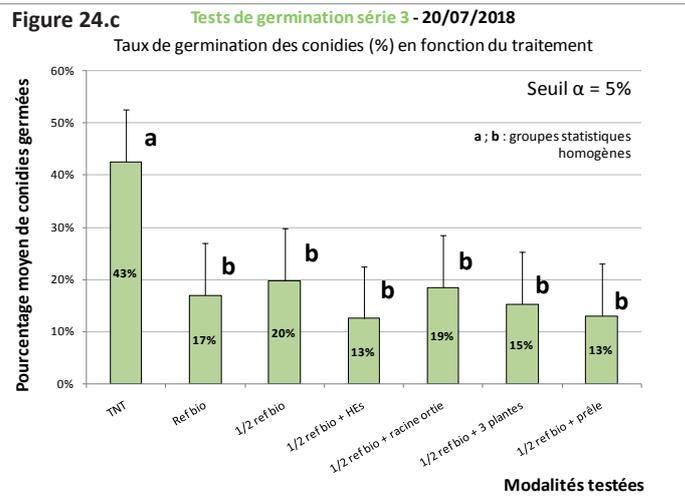
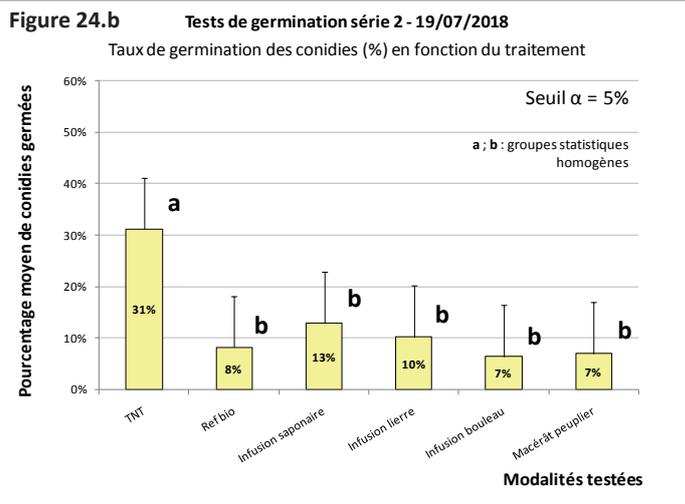
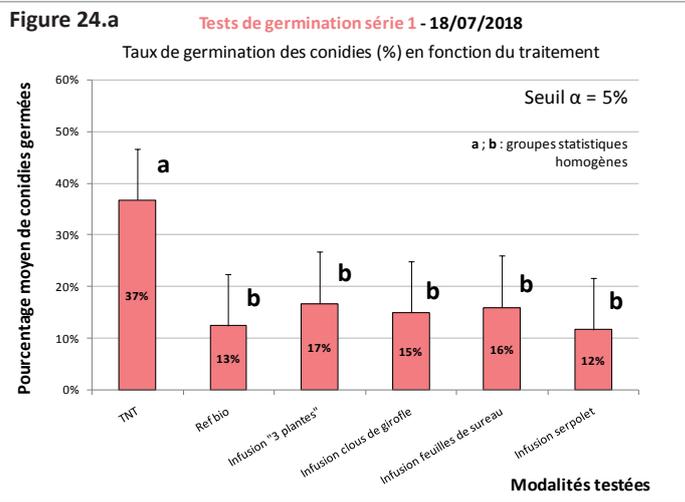


Figure 24 : Résultats tests de germination - Histogramme de série
source : Charlotte BODART, 2018

2. Caractérisation des extraits employés au laboratoire

a. Composition théorique des différentes infusions et du macérât alcoolique de peuplier

Les résultats sont donnés dans le **Tableau 14**. Ils exposent les principales molécules végétales qui d'après la bibliographie devraient théoriquement, au regard de l'espèce botanique et de son mode d'extraction, se retrouver dans les infusions de saponaire, de feuilles de lierre, de feuilles de bouleau et dans le macérât alcoolique de bourgeons de peuplier.

b. Composition des extraits secs d'INDENA

Les résultats sont exposés dans le **Tableau 15**. Ils donnent les composés « traceurs » identifiés et leur dosage selon le lot de fabrication de l'extrait sec d'écorces de chêne, de pépins de raisin ou de thé vert. La plupart d'entre eux appartiennent à la famille des composés phénoliques (un acide phénol et différents flavonoïdes).

Tableau 14 : Liste non-exhaustive des composés constituant théoriquement les extraits testés au laboratoire
source : Charlotte BODART, 2018

Infusion de saponaire - <i>Saponaria officinalis</i>		Composition phytochimique		Sources	
Composés phénoliques	flavonoïdes			Bruneton, 1999 ; Budan et al, 2014	
Terpènes	saponosides	glycoside de l'acide quillayique		Bruneton, 1999 ; Petiot et Bertrand, 2008 ; Jia et al, 1998	
Terpènes	saponosides	saponarioside A		Jia et al, 1998 ; Budan et al, 2014	
Terpènes	saponosides	saponarioside B		Jia et al, 1998 ; Budan et al, 2014	
Infusion de feuilles de lierre - <i>Hedera helix</i>		Composition phytochimique		Sources	
Composés phénoliques	flavonoïdes	rutoside		Bruneton, 1999	
Terpènes	saponosides (5 à 8%)	hédérasaponines B à I	dérivés de l'acide oléanolique, de l'hédéragénine ou de la bayogénine	Bruneton, 1999	
Infusion de feuilles de bouleau - <i>Betula pubescens</i>		Composition phytochimique		Sources	
Composés phénoliques	acides phénols			Bruneton, 1999	
Composés phénoliques	acides phénols	acide gallique		Ossipov et al, 1996	
Composés phénoliques	acides phénols	acide chlorogénique		Ossipov et al 1996 ; Keinänen et Julkunen-Tiitto, 1998	
Composés phénoliques	acides phénols	acide néo-chlorogénique		Ossipov et al, 1996	
Composés phénoliques	flavonoïdes (2-3%)			Bruneton, 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	hypéroside		Bruneton, 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	rutoside		Bruneton, 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	quercitrosides		Ossipov et al, 1996, Bruneton 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	3-O-glucuronyl		Bruneton 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	3-O-arabinosyl		Bruneton 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	hétérosides du kaempférol		Ossipov et al 1996; Keinänen et Julkunen-Tiitto 1998 ; Bruneton 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	hétérosides du myricétol		Ossipov et al 1996; Keinänen et Julkunen-Tiitto 1998 ; Bruneton 1999	
Composés phénoliques	flavonoïdes	lutéoline (dérivés)		Keinänen et Julkunen-Tiitto, 1998	
Composés phénoliques	flavonoïdes	naringinine		Ossipov et al, 1996	
Macérât alcoolique bourgeons de peuplier - <i>Populus nigra</i>		Composition phytochimique		Sources	
Composés phénoliques	acides phénols	acide p-coumarique		Dudonné et al, 2011 ; Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	acides phénols	acide férulique		Dudonné et al, 2011 ; Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	acides phénols	acide caféique		Dudonné et al, 2011 ; Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	acides phénols	acide chlorogénique		Dudonné et al, 2011 ; Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	flavonoïdes	isoquercétine		Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	flavonoïdes	quercétine		Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	flavonoïdes	kaempférol		Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	flavonoïdes	lutéoline		Benedec et al, 2014	
Composés phénoliques	flavones	apigénine		Benedec et al, 2014	

Tableau 15 : Traceurs dosés dans extraits secs fournis par INDENA
source : Charlotte BODART, 2018

Extrait sec écorces chêne - <i>Quercus robur</i>				
Lot : 37CN40090				
Composé				Quantité (%)
Composés phénoliques	(dont acide gallique)			65
Extrait sec pépins de raisin - <i>Vitis vinifera</i>				
Lot : 36LC68090				
Composé				Quantité (%)
Composés phénoliques	flavonoïdes	catéchines et épicatechines		9,2
Extrait sec thé vert - <i>Camellia sinensis</i>				
Lot : 36TVD0190				
Composé				Quantité (%)
Composés phénoliques	flavonoïdes	flavanols	catéchines 3-O-gallate	18,9
Alcaloïdes			caféine	5,8

IV - DISCUSSION

A. Retour sur l'expérimentation au verger

1. Interprétation des résultats

a. Incohérences dans les résultats inhérents au traitement «Référence bio»

Au premier comptage le nombre de rosettes tachées révèle que les arbres de la modalité T1 « Référence Bio », c'est-à-dire ceux ayant reçu le plus cuivre et donc supposés être les mieux protégés vis-à-vis de *V. inaequalis* sont significativement plus touchés que toutes les autres modalités, témoin non traité inclus. Au second comptage, les nombres de rosettes et de feuilles de rosette tavelées révèlent une situation similaire. Bien que cette fois les arbres non traités soient significativement plus touchés, la modalité T1 est significativement plus infestée que la modalité T2 « ½ référence bio » et les autres modalités ayant reçu la moitié moins de cuivre. Il est difficile d'expliquer ces résultats incohérents au regard de l'hypothèse de départ stipulant que l'efficacité des traitements cupriques est positivement corrélée à la quantité de cuivre métal appliquée. Ceux-ci peuvent néanmoins être potentiellement dus au fait que pour ces comptages les taux d'organes touchés restaient, même pour les plus hauts, relativement très faibles, et bien que l'analyse statistique des données révèle une différence significative, une contamination plus importante aurait peut-être permis au traitement « Référence bio » de prouver la supériorité de son efficacité. Une erreur dans l'application des traitements n'est pas à écarter et constitue une explication tout à fait plausible. Cette incohérence peut contrarier l'accréditation de la qualité de l'expérimentation et ainsi remettre en question la validité des résultats observés.

b. Observation de l'efficacité significative d'un extrait

Le premier comptage sur feuilles et pousses de bourse et celui sur fruits (fréquence et intensité d'infestation) révèlent l'efficacité de tous les traitements vis-à-vis de T0 sans que l'un ne soit supérieur à l'autre, pas même T1 « Référence bio » par rapport à T2 « ½ référence bio ». Le premier comptage permet néanmoins de distinguer l'efficacité significative du traitement T5 Infusion « trois plantes », avec un taux de feuilles tavelées nul. Bien que celle-ci soit moins précise, l'analyse statistique des données issues du second comptage appuie ces résultats en plaçant parmi les traitements tous significativement différents le traitement T5 comme étant le plus efficace.

La majorité des résultats montre l'absence de différence significative entre la modalité traitée avec seule la « ½ référence bio » et celles ayant reçu la « ½ référence bio » et les extraits végétaux racine d'ortie, prêle et huiles essentielles, et ne permettent ainsi pas d'avancer que l'ajout d'un de ces extraits à la bouillie optimise l'efficacité du traitement cuprique. Seul le traitement contenant l'infusion de clous de girofle, feuilles de sureau et serpolet a montré une efficacité supérieure à la « ½ référence bio » seule. Cette infusion aurait ainsi la capacité d'augmenter l'efficacité du traitement cuprique et pourrait constituer un extrait intéressant à travailler pour être utilisé en vue de réduire les doses de cuivre dans les traitements. Il est à présent intéressant de se pencher sur la composition phytochimique de cet extrait. Celui-ci contient potentiellement de nombreux composés phénoliques, notamment des acides phénols (acide rosmarinique, acide gallique, acide salicylique...), une coumarine (eugénol,) des flavonoïdes (rutine, quercétine,...), des familles de composés largement réputées pour leurs propriétés antifongiques et SDP. Leur composition réelle n'a malheureusement pu être approchée que par la recherche et la quantification d'un seul traceur, la rutine contenue dans les feuilles de sureau. L'analyse HPLC de la décoction de racine d'ortie supposée contenir la coumarine scopolétine citée pour ses propriétés antifongique n'a pas permis d'en détecter, tout comme l'expérimentation au verger n'a pas permis de montrer l'efficacité du traitement T4. L'absence de scopolétine pourrait néanmoins expliquer de manière concevable l'inefficacité de la décoction de racine d'ortie à limiter le développement de la tavelure au verger, et éventuellement remettre en question la qualité de l'extraction ou du matériel végétal utilisé.

2. Analyse critique de la méthode

L'étude d'extraits végétaux sur le développement de la tavelure au verger a eu recours à une méthode pouvant faire l'objet de nombreuses critiques et améliorations dont les plus criantes seront abordées dans cette sous partie.

a. Expérimentation au verger

Plusieurs points peuvent être soulevés quant à la mise en place et au déroulement de l'essai au verger :

Plan d'expérimentation

Différents aspects du plan d'expérimentation imposé en début de stage méritent d'être revus. Dont notamment l'absence de zones de bordure aux extrémités de chaque rang, celles-ci constituent pourtant une précaution essentielle à intégrer dans un plan expérimental. L'absence d'un minimum de un rang de garde non traité entre les rangs faisant l'objet de la notation est également très problématique ; en effet, les arbres du rang non traité reçoivent obligatoirement par dérive les produits du rang traité, la mise en place d'un ou plusieurs rangs intermédiaires aurait permis de créer une zone tampon pour palier la dérive des produits d'un rang à l'autre. L'importante différence de surface et de nombre d'arbres au sein des parcelles élémentaires et des modalités constitue également un défaut notable du plan d'expérimentation pouvant non seulement avoir un impact sur l'effet des traitements mais également affecter l'exactitude de l'analyse statistique des données qui considère les blocs comme étant de taille homogène

Choix des extraits et des traitements

Les extraits employés au verger ont été sélectionnés sans consultation de la littérature scientifique au préalable, négligeant ainsi le travail préliminaire de choix des extraits, au regard de leur efficacité, de leur composition et de leur mode d'action, qui aurait probablement dû constituer une première étape précédant la mise en place d'essais *in vitro* ou *in vivo*. Du fait que les extraits et doses employés au verger n'ont pas tous fait l'objet de tests préliminaires visant à déterminer s'ils présentent une potentielle action antifongique à l'encontre de *V. inaequalis*, il aurait peut-être été plus adéquate de chercher à montrer l'efficacité de chacun d'eux seuls dans un premier temps avant de se focaliser directement sur leur capacité à améliorer l'efficacité d'un traitement de référence en Agriculture Biologique. Ainsi, l'ajout de la « ½ référence bio » à chaque extrait testé, additionné au fait qu'il n'a pas pu être montré que la pleine dose de cuivre est plus efficace que la demie dose, limite la possibilité d'observer des différences d'efficacité entre les extraits et, vis-à-vis d'un traitement de référence.

Inoculum

Historiquement la parcelle choisie pour mener l'essai n'a jamais fait l'objet d'expérimentation sur la tavelure, toujours traitée conventionnellement et rigoureusement, elle n'a donc jamais été soumise à de réelles infestations par *V. inaequalis*, dont l'inoculum est ainsi très faible. Bien que des feuilles tavelées aient été disposées sous les arbres à l'automne en amont de l'expérimentation, compte tenu du passé « sans taches » de la parcelle, cette simple disposition, à laquelle s'ajoute la pression de l'année, n'aurait pas vraiment permis de recréer un inoculum suffisant pour assurer des contaminations intéressantes (Comm. pers., Bergamini, 2018). Cela peut éventuellement expliquer le fait que les premières contaminations n'ont pas été assez puissantes ou n'ont pas eu lieu assez tôt pour infecter les rosettes à des taux suffisamment intéressants. Laissant, par conséquent, les témoins non traités très peu infestés lors du premier comptage sur rosettes, et offrant difficilement la possibilité d'observer des différences significatives entre les modalités de traitement.

Notations

Certains résultats montrent d'autre part des défauts pouvant être liés à la qualité de la notation et de sa méthode. Par exemple le premier comptage sur rosettes indique pour la modalité T1 un taux d'organes tavelés de 4% qui chute étrangement à moins de 1% au second comptage ; or ce phénomène ne peut

Tableau 16 : Tableau de comparaison de la composition des extraits en quelques métabolites secondaires récurrentes et/ou connues pour leur rôle dans la défense des plantes contre les attaques fongiques de plusieurs extraits testés en source : Charlotte BODART, 2018

Métabolite secondaire	Extrait testé de :								
	Ortie	Prêle	Clou de girofle	Sureau	Serpolet	Saponaire	Bouleau	Lierre	Peuplier
acide caféique			x		x				x
acide chlorogénique		x			x		x		x
acide férulique	x		x		x				x
acide gallique			x				x		
acide p-coumarique	x								x
apigénine et glycosides		x							x
isoquercétine		x							x
kaempférol et glycosides	x		x		x		x		x
lutéoline et glycosides					x		x		x
myrcétine et glycosides	x		x				x		
quercétine et glycosides	x	x	x	x			x		x
rhamnetine et glycosides			x	x					
rutine	x			x					
saponosides		x	x		x	x		x	

pas s'expliquer par l'apparition de nouvelles feuilles de rosette, inexistante entre les deux comptages. A moins qu'une autre explication, comme la chute des feuilles de rosette tavelées, se cache derrière ces résultats, ceux-ci peuvent potentiellement être révélateurs d'une faille dans les notations réalisées au verger.

b. Caractérisation des extraits

Les résultats obtenus pour la caractérisation chimique des extraits ne permettent pas d'avancer des hypothèses quant à l'efficacité de l'infusion «trois plantes» au regard de sa composition, étant donné qu'une seule molécule, la rutine, a pu être recherchée et dosée. De plus les résultats de l'analyse HPLC donnent le pourcentage de rutine dans le pourcentage de résidus secs issus de l'extrait. La quantité de rutine contenue dans l'extrait peut être calculée en prenant en compte la quantité de solvant perdue lors de l'extraction (absorption par la plante et évaporation). Ignorant l'importance de ce paramètre au moment de la fabrication de l'extrait, celui-ci n'a pas été relevé, empêchant ainsi de donner la quantité de chaque molécule dans l'extrait pour lequel elle a été dosée.

B. Retour sur l'expérimentation au laboratoire

1. Interprétation des résultats avec les extraits testés au verger

Les résultats observés pour la troisième série de tests de germination (produits identiques à ceux du verger), montrent d'une part la même incohérence dans l'absence de différence significative entre les deux doses de cuivre, ici dans leur capacité à empêcher la germination des conidies *in vitro*. D'autre part, ils ne mettent aucunement en avant l'efficacité d'un des traitements par rapport aux autres, pas même celle de l'infusion « trois plantes » pourtant décelée à l'occasion de l'expérimentation *in vivo* au verger. Considérant l'effet intéressant de l'infusion « trois plantes » sur la limitation des symptômes de tavelure au verger, la première série de tests de germination a cherché à la décortiquer pour avancer des hypothèses quant à l'activité individuelle, ou liée à un phénomène de potentialisation ou de synergie (Philogène, 2008), de l'infusion de chacune des trois plantes séparées. Les quatre infusions ont ainsi montré des propriétés anti germinatives significatives par rapport au témoin non traité et équivalentes au traitement « ½ référence bio ». Cela peut permettre d'avancer que l'infusion « trois plantes » et l'infusion de chacune d'entre elles, présente un mode d'action antifongique (rien ne permet de conclure quant à d'éventuelles propriétés SDP). Aucune différence n'a néanmoins permis de les séparer et ainsi de juger du rôle, de l'importance, et de l'interaction de l'infusion de l'une ou l'autre des trois plantes.

2. Interprétation des résultats avec les autres extraits

a. Tests de germination

Les trois séries de tests de germination (1,2 et 4) menées à la Morinière indiquent que tous les extraits végétaux testés auraient tendance à empêcher de manière significative la germination de conidies de *V. inaequalis in vitro*. Ceux-ci se différencient du témoin n'ayant reçu aucun traitement au sein de leur propre série de tests, et montre une activité anti germinative significative similaire à celle d'un traitement composé de cuivre et de soufre « ½ référence bio ». Ces résultats sont néanmoins à considérer avec recul, l'analyse critique, qui suit, de cette expérimentation remet largement en question la qualité et la validité de la méthode employée.

b. Caractérisation des extraits

L'hypothèse de départ attribue l'activité antifongique des extraits végétaux à leur composition chimique. Dans la mesure où tous ceux testés semblent montrer des propriétés anti germinatives similaires, les métabolites secondaires propres à chaque extrait n'ont pas pu faire l'objet de suppositions quant à leur implication spécifique dans l'activité antifongique du produit. Néanmoins un tableau à double

entrée a été réalisé dans le but de croiser les informations liées à la caractérisation des extraits et leur efficacité anti germinative semblable, il souligne ainsi l'occurrence des métabolites secondaires les plus représentées au sein de chaque extrait (hors extraits secs de pépins de raisin, thé vert et écorces de chêne) (**Tableau 16**). Certaines molécules sont ainsi particulièrement représentées au sein des extraits c'est notamment le cas de la quercétine et de ses glycosides et du kaempférol et de ses glycosides tous connus pour leur caractère antifongique (Dixit *et al*, 1976 ; Grayer et Harborne, 1994). D'autre part, certains extraits de plantes seraient particulièrement riches de ses métabolites secondaires, comme l'infusion de clous de girofle qui n'en contiendrait pas moins de huit, ou encore le macérât alcoolique de bourgeon de peuplier qui serait susceptible d'être composé de neuf de ces molécules. Il est intéressant de relever que l'infusion « trois plantes » qui s'est démarquée lors de l'expérimentation au verger contient du clou de girofle, et que la bibliographie souligne particulièrement les propriétés antifongiques des extraits alcooliques de bourgeons de peuplier à l'égard de *V. inaequalis* (Thiesz *et al*, 2007 ; Bálint *et al*, 2014). La présence théorique de saponosides à la fois dans l'infusion de clous de girofle et de serpolet (pour lesquelles elles n'avaient cependant pas été retenues comme traceurs) constitue une information remarquable pouvant potentiellement entrer dans l'explication de l'efficacité significative de l'infusion «trois plantes» au verger.

3. Analyse critique de la méthode

a. Tests de germination

Avant d'être appliquée pour réaliser les tests de germination *in vitro* dans le but d'évaluer le pouvoir antifongique des extraits végétaux, la méthode employée a fait l'objet de plusieurs mises au point.

Suspension de conidies

La méthode d'obtention de la suspension de spores à particulièrement été travaillée. Celle-ci a notamment évolué par étapes en passant d'un nombre de 20 à 40 feuilles tavelées pour 50cl d'eau, les feuilles qui étaient rincées entières par la suite été découpées pour ne garder que les parties tachées afin d'augmenter la quantité de spores dans la solution. Un premier essai a consisté à laisser tremper les feuilles dans l'eau durant une trentaine de minutes avant de soutirer la suspension de spores ; cette méthode a rapidement été écartée du fait que les spores une fois dans l'eau pouvaient entamer leur germination, au profit de la technique décrite plus tôt.

Enchaînement logique des étapes de l'expérimentation

L'organisation dans la mise en place des tests a également fait l'objet de révisions avant d'être appliquée aux séries étudiées. Une première méthode avait effectivement consisté à préparer les unités expérimentales (fabrication de la solution de spore et mise en contact avec les produits) tôt dans la matinée, attendre que les spores puissent germer dans le témoin non traité, et effectuer les comptages dans la même journée. Pour des contraintes évidentes d'horaires de travail, le temps laissé aux conidies pour germer ne pouvait jamais excéder trois à quatre heures, et restreindre les taux de germination observé au comptage. Pour optimiser les pourcentages de germination dans les témoins non traités, la préparation des essais a été réalisée la veille au soir et les comptages le lendemain matin afin d'optimiser les taux de germination de conidies toute une nuit, soit plus de douze heures en solution.

Les différents ajustements apportés à la méthode n'ont néanmoins pas suffi pour pallier nombre de défauts majeurs affectant très sérieusement la qualité et la fiabilité des résultats observés. Plusieurs failles inhérentes aux tests de germination peuvent ainsi être désignées, discutées et expliquées :

Taux de germination des témoins hétérogène

Les taux de germination dans les témoins non traités, malgré le temps d'attente entre la mise en place de l'essai et le comptage, sont restés assez bas et ont surtout présenté une hétérogénéité notable au sein d'une même série. Le premier point peut s'expliquer par les très fortes chaleurs qui ont sévi au mois de juillet au moment où les quatre séries de tests de germination ont été réalisées. Celles-ci auraient

naturellement freiné le développement des spores de *V. inaequalis* ; de plus, les taches prélevées sur les feuilles tavelées étaient, du fait de la saison avancée et du climat sec, relativement vieilles et pour certaines quelque peu desséchées (bien que la plupart d'entre elles aient été écartées). Le second point pourrait trouver une explication dans la variabilité liée à l'appréciation du compteur. En effet une autre personne a parfois participé aux comptages des conidies. Néanmoins, celle-ci comptait chaque unité expérimentale d'une répétition, or aucun effet lié à la répétition n'a été détecté lors de l'analyse statistique des données.

Concentrations en conidies hétérogènes

Le nombre de spores relativement variable d'une unité expérimentale observée à une autre au sein d'une même série, voire d'une même répétition, constitue lui aussi une irrégularité très probablement due à la méthodologie développée. Ce manque d'homogénéité hautement susceptible d'impacter la fiabilité des résultats, s'est occasionnellement révélé problématique d'un point de vue pratique dans la mesure où certaines unités expérimentales présentaient (sans lien à la modalité ou à la répétition) une très faible concentration de conidies, si bien qu'il était parfois laborieux d'y dénombrer cent spores. Cette variabilité s'explique du fait que la manière de prélever la suspension de spores dans le contenant à l'aide d'une pipette ne permettait pas d'assurer des concentrations égales en conidies, malgré les efforts appliqués pour toujours prélever la suspension dans le fond du bécher.

Agglutination des conidies

En germant, les spores ont tendance à s'agglutiner pour former des amas de spores germées et non germées dont le nombre exact est très difficilement discernable (**Figure 25**). Ce phénomène altère considérablement l'exactitude des comptages et les rendent particulièrement incertains et subjectifs. Une tentative a visé à placer les pots contenant le mélange de la suspension de spores et des traitements sur un agitateur (Comm. pers., Duval-Chaboussou, 2018) afin d'empêcher l'agglutination des spores, sans succès.

Subjectivité

Enfin, la grande subjectivité inhérente au facteur humain lors du comptage des conidies, est particulièrement révélatrice de la modeste qualité des tests de germination effectués à la Morinière offrant des résultats de fiabilité hasardeuse. Bien que les précautions nécessaires aient été prises pour que chaque compteur ait la même définition visuelle d'une spore germée et d'une spore non germée, détermine de la même manière le nombre de conidies contenues dans un amas de spores agglutinées, ou sache reconnaître les conidies de *V. inaequalis* au milieu de nombreuses autres espèces (**Figure 26**), l'opération de comptage reste fondamentalement subjective.

b. Caractérisation des extraits

La majorité des extraits testés au laboratoire (bouleau, lierre, peuplier, saponaire, clou de girofle seul, sureau seul, serpolet seul) n'ont malheureusement pas pu faire l'objet d'analyses chimiques, la composition qui leur est attribuée n'est que théorique, rien n'a permis d'en vérifier l'exactitude.

C. Perspectives - propositions pour une nouvelle étude

Les limites de la démarche générale adoptée dans cette étude et les protocoles des différentes expérimentations qui l'ont constituée offrent des résultats qui ne permettent pas vraiment d'apporter une réponse à la problématique initiale de réduction des intrants phytosanitaires par les extraits végétaux dans le cadre de la lutte contre la tavelure du pommier. Les travaux effectués peuvent néanmoins alimenter la réflexion relative à la mise en place d'une nouvelle étude, complète et rigoureuse, qui se devra de pouvoir répondre à cette problématique. Ainsi, dans l'hypothèse où cette étude serait reconduite, voire ferait l'objet d'un projet sur plusieurs années, il est impératif de construire un nouveau schéma au regard de l'expérience issue du travail réalisé à l'occasion de ce stage, afin non seulement d'en recentrer les objectifs et de redéfinir les moyens et les acteurs pour y répondre. Cette sous-partie se

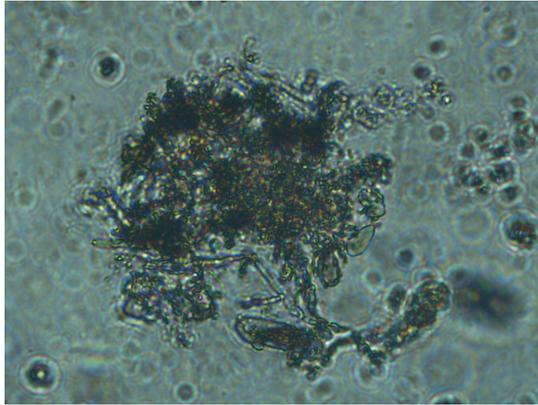


Figure 25 : Conidies de *V. inaequalis* agglutinées (x200)
source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018

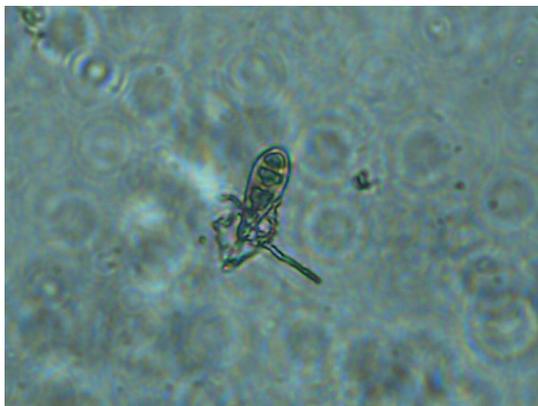


Figure 26 : Spore d'un champignon autre que *V. inaequalis* (x200)
source : Charlotte BODART, la Morinière, 20/07/2018

veut ainsi une proposition pour une démarche générale, tant dans la forme que sur le fond, qui pourrait être adoptée en perspective de la poursuite de l'étude. La **Figure 28** illustre ainsi sous forme de schéma la démarche générale qui pourrait constituer le squelette d'une nouvelle étude relative à l'utilisation d'extraits végétaux à utilité phytosanitaire pour la gestion de la tavelure du pommier. Il offre une vision d'ensemble du déroulement et de l'enchaînement des différents travaux, plus précisément décrits ci-dessous.

1. Travaux bibliographiques - choix des plantes et de leur mode d'extraction

La première étape de la nouvelle étude consisterait d'une part à reprendre la synthèse bibliographique rédigée à l'occasion de ce mémoire, à l'étayer, et à proposer une sélection d'extraits végétaux pertinents et prometteurs au regard de l'efficacité dont ils auraient déjà fait preuve, de leur composition chimique, ou de leur mode d'action supposé. La mise en place d'un partenariat avec des instituts spécialisés et compétents en phytochimie comme l'ITEPMAI serait particulièrement pertinente et opportune pour cette première phase de détermination des extraits à tester. La synthèse bibliographique réalisée à l'occasion de ce mémoire offre un certain nombre de pistes qui pourraient être explorées et exploitées, à la fois au regard de l'efficacité prouvée de certains produits mais aussi de la caractérisation chimique des extraits et du rôle des métabolites secondaires dans la protection du pommier vis-à-vis de *V. inaequalis*.

- Les plantes à saponosides citées comme le lierre, le yucca, la saponaire, etc. se démarquent particulièrement dans la bibliographie pour leur mode d'action fongicide (Gilliver, 197 ; Bengtsson *et al*, 2004; Bengtsson *et al*, 2006 ; Bengtsson *et al*, 2009 ; Jamar 2011). Il serait de fait intéressant de creuser les opportunités offertes par leur extraction, et celle d'espèces botaniques également riches en saponosides.

- Les travaux autour d'autres extraits initialement repérés dans la bibliographie, étudiés dans le cadre de ce stage, et dont la composition s'avère particulièrement étoffée en métabolites secondaires impliqués dans des mécanismes de défenses des plantes à des attaques fongiques, méritent également d'être poursuivis (clous de girofle, bourgeons de peuplier, serpolet, feuilles de bouleau, feuilles de thé vert,...).

- Une voie pourrait également être ouverte dans la recherche de nouveaux extraits à tester avec des plantes qui contiennent, comme les feuilles de thé vert, des flavan-3-ols (Bruneton, 1999) en écho aux études menées quant au rôle de cette molécule dans la défense du pommier face à *V. inaequalis* (Treutter et Feucht, 1990).

- Des essais avec les extraits d'écorce de chêne et de pépins de raisin fournis par la société INDENA pourraient être poursuivis. Ceux-ci possèdent un potentiel intéressant compte tenu de leur composition chimique riche, pour le premier en composés phénoliques dont de l'acide gallique capable d'inhiber champignons pathogènes (Grayer et Harborne, 1994), et pour le second en épicatechine capables d'induire la biosynthèse de **phytoalexines** (El Modafar *et al*, 2008).

- Enfin certaines substances végétales dont l'efficacité est relevée dans le tableau ? de la synthèse bibliographique, comme les extraits de *Juncus effusus* (Thuerig *et al*, 2006) ou encore de *Morus sp.* (Rollinger *et al*, 2016) n'ont pas été abordées dans le cadre de cette étude mais constituent également une source de possibilités à explorer.

Deux manières de sélectionner les extraits à tester peuvent se distinguer. Il s'agit soit de produits directement issus de la bibliographie, soit d'extraits déterminés à partir des métabolites secondaires d'intérêt en fonction desquelles sont recherchées les plantes et les modes d'extraction permettant de les obtenir.

2. Fabrication des extraits testés - qualité et faisabilité

Les produits doivent être stables, homogènes, leur composition connue, et reproductibles à l'identique. Cela implique notamment de proscrire la fabrication des extraits à la Morinière trop aléatoire et variable malgré le respect d'un même mode opératoire d'une préparation à une autre compte tenu des nombreux facteurs immaîtrisables. Les extraits testés doivent être issus d'un processus de fabrication observant des moyens, des compétences et des connaissances pointues, nécessaires à l'élaboration d'un produit de qualité constante en dépit des multiples variables naturelles de la matière première. Des extraits secs,



Figure 27 : Extraits secs d'INDENA : écorces de chêne, thé vert, pépins de raisin (gauche à droite)
source : Charlotte BODART, la Morinière, 24/07/2018

dosés et contrôlés, comme est capable de produire la société INDENA sont à privilégier. Ces produits sous forme de poudre (**Figure 27**) sont particulièrement commodes en termes de conservation et de stockage, à l'inverse des infusions et décoctions difficilement conservables. Le simple mélange d'une poudre formulée à la bouillie de traitement constitue une solution évidemment moins contraignante aux yeux d'un utilisateur que la préparation chronophage et astreignante d'un extrait.

3. Agencement des expérimentations - diversité d'acteurs et de compétences

La démarche générale schématisée (**Figure 28**) propose une distribution des expérimentations en deux phases successives. La première cherchant à caractériser *in vitro* le mode d'action SDP ou antifongique des extraits testés et à déterminer les doses auxquelles ils présentent une efficacité, la seconde s'appuie sur la précédente et évalue *in vivo* l'efficacité des extraits végétaux d'intérêt pour les doses retenues.

a. Détermination du mode d'action et de doses efficaces *in vitro*

Avant de tester l'efficacité d'un extrait *in vivo*, sous serre sur semis, ou au verger, il est important de connaître la nature de son mode d'action et de le comprendre pour optimiser au mieux son application. Différents types d'expérimentations peuvent ainsi être entreprises en vue d'évaluer la capacité des extraits à activer les défenses du pommier et/ou à avoir une activité antifongique à l'égard de *V. inaequalis*.

Evaluation de l'effet SDP à l'INRA d'Angers

L'équipe de Marie-Noëlle BRISSET (INRA d'Angers) a développé un outil de diagnostic moléculaire, la « puce qPFD® » (Puce à Faible Densité Quantitative), qui permet d'analyser de manière simultanée l'activation de différentes voies de défenses des plantes par un produit. Cette technologie étudie l'expression de vingt-huit gènes (sur une échelle colorée de bleu à rouge allant de la répression à l'induction du gène) impliqués dans différentes voies de défense, celle-ci renseigne quant à l'état des défenses des plantes traitées avec les produits faisant l'objet de l'expérimentation (Hamon et Clément, 2017). L'évaluation de la capacité des extraits végétaux à induire l'activation des défenses du pommier pourrait ainsi faire l'objet d'une expérimentation par qPFD® à l'INRA d'Angers.

Evaluation de l'effet antifongique *in vitro*

Le nouveau schéma d'étude élimine les tests de germination en suspension de conidies réalisés à la Morinière dans le cadre de ce stage, dont les limites trop significatives ont été décrites précédemment. L'évaluation de l'effet antifongique des extraits peut néanmoins faire l'objet d'autres types d'expérimentation *in vitro*, dont deux sont envisagées ici.

- **Tests de germination par néphélométrie à l'INRA** : les propriétés anti germinatives des extraits sur les spores de *V. inaequalis in vitro* pourraient être testées au moyen d'un protocole développé par l'INRA permettant d'étudier la cinétique de germination et de croissance des spores de *V. inaequalis* en milieu liquide, par néphélométrie. Cette technologie exploite la diffraction de la lumière (à l'inverse d'analyses de densité optique, absorbance de la lumière, inadaptées à l'étude de la croissance mycélienne), pour générer des courbes de croissance mycélienne comparées entre elles et à une culture témoin. Cette méthode est la plus quantitative et la plus fine pour ce type d'analyse, elle permet même de repérer des retards dans les courbes de croissance. (Comm.pers, Brisset, 2018)

- **Sur boîte de pétri à la Morinière** : une autre expérimentation pourrait viser à évaluer les propriétés antifongiques des extraits en étudiant leur effet sur la croissance mycélienne de *V. inaequalis* cultivée sur boîte de pétri. Cette expérimentation pourrait potentiellement être réalisée dans les locaux de la Morinière si la station parvient à acquérir les compétences et les connaissances relatives à la culture *in vitro* de *V. inaequalis* sur boîtes de pétri. Dans l'hypothèse où ce savoir-faire n'aurait pas la possibilité d'être développé à la Morinière, cette expérimentation devrait être, elle aussi, déléguée à des organismes compétents en la matière comme pourrait notamment l'être l'INRA d'Angers.

Ces expérimentations permettent à la fois de resserrer la sélection d'extraits à étudier en ciblant les plus prometteurs notamment au regard de leur mode d'action, et également, en testant plusieurs doses pour les différents extraits, de déterminer lesquelles semblent prometteuses et pertinentes à tester *in vivo*.

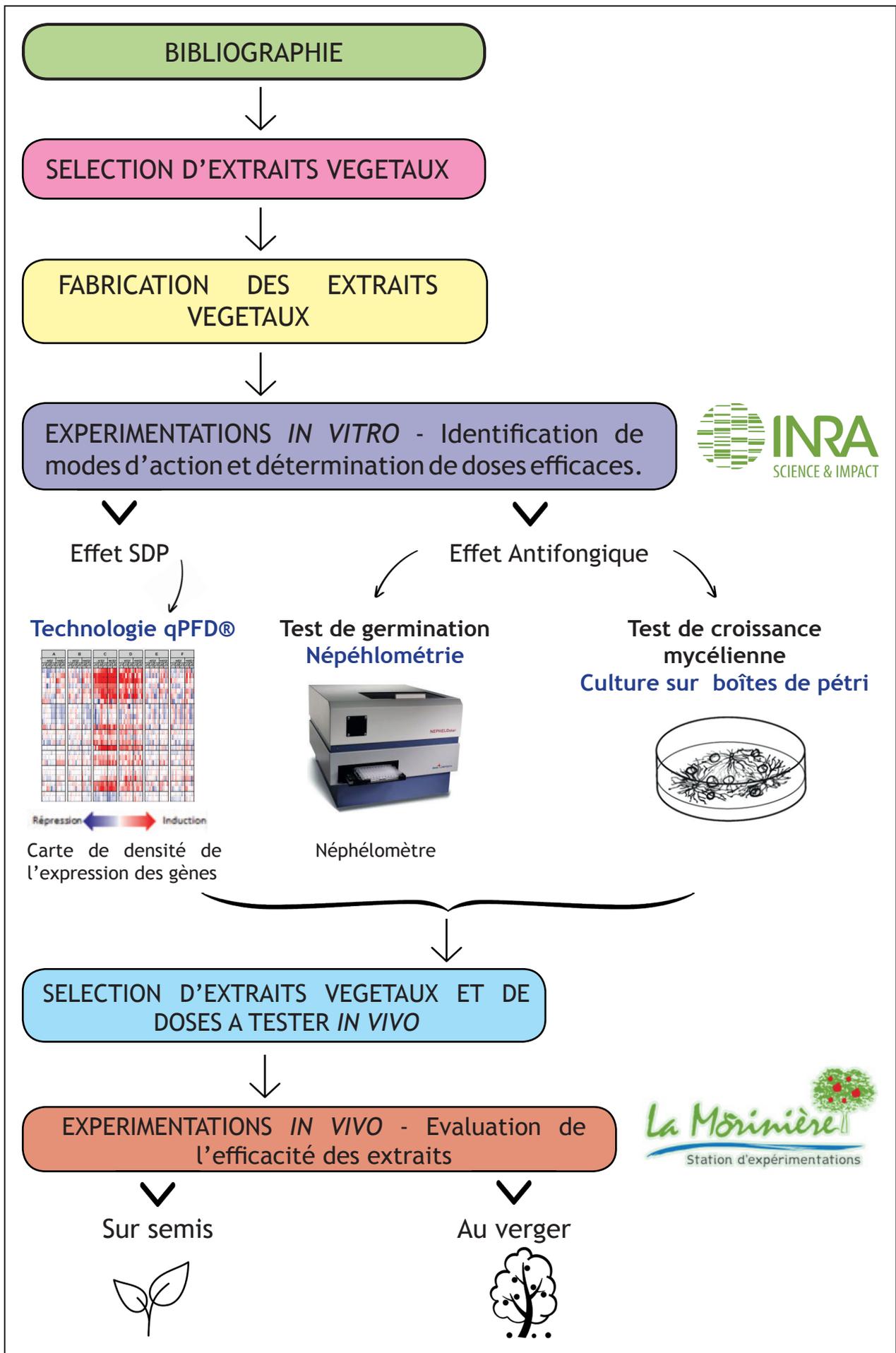


Figure 28 : Proposition d'une démarche générale à adopter en perspective d'une nouvelle étude
 source : Charlotte BODART, 24/07/2018

b. Evaluation de l'efficacité des extraits et des doses retenus *in vivo*

La seconde phase de la démarche générale proposée pour une nouvelle étude consiste à tester les extraits végétaux aux doses établies lors de la phase expérimentale précédente. Deux expérimentations différentes pourraient être menées en vue d'évaluer l'efficacité des produits *in vivo*.

Plantules sous serre : une expérimentation pourrait d'une part être menée sur plantules de pommiers sous serre. Cette méthode permet une évaluation plus rapide et moins contraignante qu'au verger (comptages et notations simplifiées) mais nécessite néanmoins des infrastructures spécifiques (serres par exemple) pour faire pousser et cultiver les plantules. Cette expérimentation pourrait être effectuée à la Morinière à l'aide d'un investissement dans de petits équipements de culture en conditions contrôlées, ou délocalisée au sein de structures équipées et dans la capacité de cultiver des plantules de pommiers.

Au verger : les extraits seraient enfin mis à l'épreuve du verger en conditions réelles de production à la Morinière, afin d'en évaluer l'efficacité et le potentiel en vue de réduire l'utilisation des intrants phytosanitaires dans la gestion de la tavelure du pommier. La mise en place d'une nouvelle expérimentation à la Morinière pourrait intégrer les remarques émises lors de la critique de la méthode employée cette année pour l'expérimentation au verger.

CONCLUSION

Cette étude concourait à estimer le potentiel offert par l'intégration d'extraits végétaux aux méthodes de lutte contre la tavelure du pommier en vue de réduire l'utilisation des produits phytosanitaires à l'égard de celle-ci. Différentes expérimentations ont été entreprises afin de tester l'efficacité de plusieurs extraits végétaux, *in vivo*, au cœur du verger de la station expérimentale de la Morinière, et en conditions *in vitro*, sur conidies de *Venturia inaequalis*. L'une des interrogations de départ questionnait notamment la capacité de ce type de produits à diminuer les doses de cuivre dans les traitements. Les extraits testés au verger ont ainsi automatiquement été expérimentés en mélange avec un traitement cuprique. Dans la plupart des cas, les résultats n'ont pas permis d'observer une efficacité plus prononcée des traitements composés par les extraits végétaux et le traitement cuprique correspondant à la « ½ référence bio » vis-à-vis des traitements cupriques de référence (« Référence bio » et « ½ référence bio »), à l'exception d'une infusion de clous de girofles, de feuilles sureau, et de serpolet. Les tests de germination menés au laboratoire n'ont néanmoins pas pu confirmer l'activité antifongique de cet extrait, et de fait, ni permis de conclure quant à son mode d'action. Effectivement, l'attribution d'un mode d'action SDP ou antifongique aux extraits, n'a pu être réalisée dans le cadre de cette étude. Pour ce faire, les travaux doivent être poursuivis, et approfondis via de nouvelles expérimentations exploitant certaines technologies de pointe comme la puce qPFD® ou l'analyse de croissance fongique par néphélométrie.

Cette étude a néanmoins été à l'origine d'une synthèse bibliographique internationale qui a recensé, de la manière la plus exhaustive possible, l'ensemble des études scientifiques et savoirs empiriques, relatifs à l'utilisation d'extraits végétaux contre *V. inaequalis*. Les informations ainsi récoltées ouvrent de nombreuses perspectives résidant, à la fois dans le succès de certains produits, qu'il serait intéressant de tester dans le cadre d'une prochaine étude ; mais également, dans l'importance et le rôle joué par la composition phytochimique des extraits au regard de leur efficacité et de leur mode d'action.

Cette étude a donc constitué une première approche en vue de statuer quant au potentiel offert par les extraits végétaux pour diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires chez les arboriculteurs dans la lutte contre la tavelure du pommier. N'ayant pu apporter de réponse précise à la question soulevée par la problématique de départ, elle encourage à la poursuite des travaux au regard des avancées, notamment bibliographiques, réalisées dans le cadre de ce stage, et de l'analyse critique de la démarche empruntée. Aussi, il serait plus spécialement nécessaire de porter une attention particulière à la compréhension du mode d'action des extraits végétaux, inhérente à leur composition phytochimique, afin d'appréhender

au mieux dans quelle mesure ils peuvent être employés de manière efficace et reproductible chez les arboriculteurs. Ces dernières notions revêtent effectivement une importance cruciale, et se doivent d'être approfondies pour optimiser l'utilisation des extraits végétaux dans les vergers (formulation des produits, périodes d'application, doses utilisées), et en faire un outil de lutte efficace. Les travaux autour de la composition et de la caractérisation des extraits végétaux sont également essentiels, dans la mesure où, un produit, pour être employé manière efficace et reproductible sur le terrain, se doit d'être stable, homogène, et commode d'utilisation. La fabrication d'extraits secs et dosés, par des professionnels de l'extraction végétale, se dessine ainsi comme une piste intéressante.

Il convient enfin d'affirmer que la réduction de l'usage des produits phytosanitaires à l'encontre de *V.inaequalis*, ne peut passer par la découverte et l'élaboration de substances visant uniquement à les remplacer. Les extraits végétaux ne peuvent ainsi pas se substituer seuls aux produits phytosanitaires, l'alternative réside effectivement, à la fois dans l'intégration de ceux-ci à de nombreuses stratégies de lutte complémentaires d'ordre physique, biologique et génétique, et dans l'optimisation de leur utilisation (positionnement stratégique des applications, qualité des extraits,...).

Les produits d'origine végétale étudiés dans cette étude sont issus d'un processus d'extraction des composés contenus dans différents organes de plantes, mais ils n'en constituent néanmoins pas la seule source d'obtention existante. La technologie PAT®, ou « Plantes à traire », en partie développée par l'INRA, exploite ainsi les exsudats racinaires des plantes et leur richesse en métabolites secondaires. Son principe consiste à cultiver des plantes en hydroponie et à les soumettre à différents traitements (ajout d'éliciteurs, stimulation de la photosynthèse,...), dans le but de forcer l'excrétion de molécules racinaires dans la solution hydroponique et, de récupérer ces dernières tout en maintenant les plantes vivantes, encore exploitables, car toujours dans la capacité de produire des exsudats (Gontier et al, 2008). Ce procédé, particulièrement innovant, d'obtention de molécules actives, ouvre de belles perspectives pour la découverte et la production de produits d'origine végétale d'intérêt dans la gestion des maladies des plantes, dont fait notamment partie la tavelure du pommier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGENCE BIO, 2018. Données de synthèse par filière et évolution- Productions végétales certifiées en 2017. 2018. [Tableur]
- AGRESTE, 2015. Pratiques phytosanitaires en arboriculture- Des traitements phytosanitaires dans les vergers de pommiers variables selon les bassins de production. . 2015. N° n°323.
- AGRIOS, George N., 2012. Plant Pathology. Elsevier. ISBN 978-0-323-13969-4.
- AGROBIO 47, 2012. Guide technique des préparations à base de plantes. décembre 2012.
- AOYAMA, Masakazu et NAGUMO, Toshiyuki, 1996. Factors Affecting Microbial Biomass and Dehydrogenase Activity in Apple Orchard Soils with Heavy Metal Accumulation. Soil Science and Plant Nutrition. décembre 1996. Vol. 42, n° 4, pp. 821 831. DOI 10.1080/00380768.1996.10416629.
- AOYAMA, Masakazu et NAGUMO, Toshiyuki, 1997. Effects of heavy metal accumulation in apple orchard soils on microbial biomass and microbial activities. Soil Science and Plant Nutrition. septembre 1997. Vol. 43, n° 3, pp. 601 612. DOI 10.1080/00380768.1997.10414786.
- AOYAMA, Masakazu et TANAKA, Ryo, 2013. Effects of Heavy Metal Pollution of Apple Orchard Surface Soils Associated with Past Use of Metal-Based Pesticides on Soil Microbial Biomass and Microbial Communities. Journal of Environmental Protection. 2013. Vol. 4, n° 4, pp. 27 36. DOI 10.4236/jep.2013.44A005.
- ARSLAN, Umit, ILHAN, Kadir et KARABULUT, Ozgur Akgun, 2013. Evaluation of the Use of Ammonium Bicarbonate and Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Extract on the Control of Apple Scab. Journal of Phytopathology. juin 2013. Vol. 161, n° 6, pp. 382 388. DOI 10.1111/jph.12082.
- ASGARPANA, Jinous et ROOHI, Elnaz, 2012. Phytochemistry and pharmacological properties of *Equisetum arvense* L. Journal of Medicinal Plants Research [en ligne]. 9 juin 2012. Vol. 6, n° 21. [Consulté le 25 août 2018]. DOI 10.5897/JMPR12.234. Disponible à l'adresse : <http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/9June/Asgarpanah%20and%20Roohi.htm>
- ATKINSON, Mark D. et ATKINSON, Elaine, 2002. *Sambucus nigra* L. Journal of Ecology. 2002. Vol. 90, n° 5, pp. 895–923.
- BÁLINT, János, NAGY, Szilveszter, THIESZ, Rezső, NYÁRÁDI, Imre-István et BALOG, Adalbert, 2014. Using plant extracts to reduce asexual reproduction of apple scab (*Venturia inaequalis*). TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY. 2014. Vol. 38, pp. 91 98. DOI 10.3906/tar-1302-17.
- BENEDEC, Daniela, ONIGA, Iliora, MURESAN, Bianca, MOT, Augustin C., DAMIAN, Grigore, NISTOR, Adriana, SILAGHI-DUMITRESCU, Radu, HANGANU, Daniela, DUMA, Mihaela et VLASE, Laurian, 2014. Contrast between Water- and Ethanol-Based Antioxidant Assays: Aspen (*P. opulus tremula*) and Black Poplar (*P. opulus nigra*) Extracts as a Case Study: Contrast between Water- and Ethanol-Based Antioxidant Assays. Journal of Food Quality. août 2014. Vol. 37, n° 4, pp. 259-267. DOI 10.1111/jfq.12090.
- BENGTSSON, Marianne, JØRGENSEN, Hans J. Lyngs, PHAM, Anh, WULFF, Ednar et HOCKENHULL, John, 2006. Screening of organically based fungicides for apple scab (*Venturia inaequalis*) control and a histopathological study of the mode of action of a resistance inducer. IOBC/wprs Bulletin. 2006. Vol. 29, n° 1, pp. 123–127.
- BENGTSSON, Marianne, WULFF, Ednar, PEDERSEN, Hanne Lindhard, PAASKE, Klaus, JØRGENSEN, Hans J. Lyngs et HOCKENHULL, John, 2004. New fungicides for apple scab control in organic growing. Newsletter from Danish Research Centre for Organic Farming. 2004. N° 3.
- BENGTSSON, M., WULFF, E., LYNGS JØRGENSEN, H. J., PHAM, A., LÜBECK, M. et HOCKENHULL, J., 2009. Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. European Journal of Plant Pathology. juin 2009. Vol. 124, n° 2, pp. 187 198. DOI 10.1007/s10658-

008-9405-z.

BERNADETTE, Laurent et BOUCHARD-AERTS, Véronique, 2017. Pomme. En octobre 2017, le marché de la pomme de table est peu actif et, dans un contexte de faiblesse de la production, les cours se maintiennent au dessus de ceux des précédentes campagnes. . 2017. N° n°2017-171.

BERNARDON-MÉRY, Aude, JOUBERT, Jean-Marie et HOAREAU, Alphonse, 2013. La laminarine contre la tavelure du pommier. *Phytoma*. mars 2013. N° 662, pp. 4.

BERTRAND, Bernard, COLLAERT, Jean-Paul et PETIOT, Eric, 2004. Purin d'ortie et compagnie: les plantes au secours des plantes. Sengouagnet : Éditions de Terran. ISBN 978-2-913288-32-4. OCLC: 77030350

BERTRAND, Cédric et ANDREU, Vanessa, 2013. Caractéristiques et intérêts des préparations à base de plantes. Journées Substances Naturelles en Protection des Cultures. Paris. 4 septembre 2013.

BOSSHARD, E., SCHÜEPP, H. et SIEGFRIED, W., 1987. Concepts and methods in biological control of diseases in apple orchards 1. *EPPO Bulletin*. 1987. Vol. 17, n° 4, pp. 655–663.

BRUNETON, Jean, 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3. éd. rev. et augm. Paris : Ed. Tec & doc-Lavoisier [u.a.]. ISBN 978-2-7430-0315-9. OCLC: 247277604

BUDAN, Alexandre, BELLENOT, Denis, FREUZE, Ingrid, GILLMANN, Louisa, CHICOTEAU, Pierre, RICHOMME, Pascal et GUILLET, David, 2014. Potential of extracts from *Saponaria officinalis* and *Calendula officinalis* to modulate *in vitro* rumen fermentation with respect to their content in saponins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. février 2014. Vol. 78, n° 2, pp. 288-295. DOI 10.1080/09168451.2014.882742.

CORTÉS-ROJAS, Diego Francisco, DE SOUZA, Claudia Regina Fernandes et OLIVEIRA, Wanderley Pereira, 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. février 2014. Vol. 4, n° 2, pp. 90-96. DOI 10.1016/S2221-1691(14)60215-X.

D'ABROSCA, Brigida, DELLAGRECA, Marina, FIORENTINO, Antonio, MONACO, Pietro, PREVITERA, Lucio, SIMONET, Ana M. et ZARRELLI, Armando, 2001. Potential allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry*. 2001. Vol. 58, n° 7, pp. 1073–1081.

DELLA-TORRE, Aurélie et BELLENOT, Denis, 2016. Les extraits végétaux en protection des cultures. décembre 2016. ITEPMAI.

DIDELOT, F, GIRAUD, M et CAFFIER, V, 2018. Di@gno-Pom - Biologie, épidémiologie. *ephytia* [en ligne]. 2018. [Consulté le 24 août 2018]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20848/Di-gno-Pom-Biologie-epidemiologie>

DIXIT, S. N., TRIPATHI, S. C. et UPADHYAY, R. R., 1976. The antifungal substance of rose flowers (*Rosa indica*). *Economic Botany*. 1976. Vol. 30, n° 4, pp. 371–374.

DUDONNÉ, Stéphanie, POUPARD, Pascal, COUTIÈRE, Philippe, WOILLEZ, Marion, RICHARD, Tristan, MÉRILLON, Jean-Michel et VITRAC, Xavier, 2011. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 11 mai 2011. Vol. 59, n° 9, pp. 4527-4536. DOI 10.1021/jf104791t.

EL MODAFAR, Cherkaoui, EL BOUSTANI, Es-Saddiq et EL AABIDINE, Amal Zine, 2008. Rôle des polyphénols dans la défense naturelle des plantes contre les phytopathogènes. Résistance du palmier dattier à la fusariose. In : *Biopesticides d'origine végétale*. 2ème édition. Paris : Éditions Tec & doc. pp. 18. ISBN 978-2-7430-1081-2. OCLC: 403584469

FELIPINI, Ricardo B., BONETI, José I., KATSURAYAMA, Yoshinori, NETO, Argus C. Rocha, VELEIRINHO, Beatriz, MARASCHIN, Marcelo et DI PIERO, Robson M., 2016. Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*. août 2016. Vol. 145, n° 4, pp. 929-939. DOI 10.1007/s10658-016-0881-2.

FERNANDEZ, Xavier et CHÉMAT, Farid, 2012. La chimie des huiles essentielles : tradition et innovation. Paris : Vuibert. ISBN 978-2-311-01028-2. OCLC: 829410452

FRANCEAGRIMER, 2018. Les fiches de FranceAgriMer filière fruits. 2018.

FURET, Aurélie et BELLENOT, Denis, 2016. Les huiles essentielles dans la protection des cultures : une voie en cours d'exploration. décembre 2016. ITEPMAI.

GILLIVER, K., 1947. The effect of plant extracts on the germination of the conidia of *Venturia inaequalis*. *Annals of Applied Biology*. 1947. Vol. 34, n° 1, pp. 136–143.

GONTIER, Eric, DAO, Vu Thi, NASRI, Ruba, BOITEL-CONTI, Michèle et BOURGAUD, Frédéric, 2008. Racines, hydroponie et élicitation : un trinôme pour la découverte et la production de biopesticides ? In : *Biopesticides d'origine végétale*. 2ème édition. Paris : Éditions Tec & doc. pp. 13. ISBN 978-2-7430-1081-2. OCLC: 403584469

GRAYER, Renee J. et HARBORNE, Jeffrey B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*. 1994. Vol. 37, n° 1, pp. 19–42.

GRÜNDEMANN, Carsten, LENGEN, Karin, SAUER, Barbara, GARCIA-KÄUFER, Manuel, ZEHL, Martin et HUBER, Roman, 2014. Equisetum arvense (common horsetail) modulates the function of inflammatory immunocompetent cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014. Vol. 14, n° 1, pp. 283.

GUIAVARCH, Laurent, BARAT, Julie et PARAN, Ghislaine, 2012. La pomme : bilan de campagne 2010/11. 2012. FranceAgriMer.

GUIAVARCH, Laurent, 2015. La pomme : bilan de campagne 2014/15. 2015. FranceAgriMer.

GUIAVARCH, Laurent, 2017. La pomme : bilan de campagne 2016/17. 2017. FranceAgriMer.

GURJAR, Malkhan Singh, ALI, Shahid, AKHTAR, Masood et SINGH, Kangabam Suraj, 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*. 2012. Vol. 3, n° 3, pp. 425–433. DOI 10.4236/as.2012.33050.

HAMON, Céline et CLÉMENT, Juliette, 2017. qPFD® : un outil pour étudier l'induction des défenses des plantes. *Vegenov* [en ligne]. 7 novembre 2017. [Consulté le 25 août 2018]. Disponible à l'adresse : <https://blog.vegenov.com/2017/11/qpdf-outil-etudier-linduction-defenses-plantes/>

HÄSELI, Andi, SCHMUTZ, Res et FORSCHUNGSINSTITUT FÜR BIOLOGISCHEN LANDBAU, 2005. *Protection des plantes pour la production de fruits à pépins bio* Edition Suisse. Frick : FiBL. ISBN 978-3-906081-69-4. OCLC: 723373802

HOSTETTMANN, K. et MARSTON, A., 2005. *Saponins*. Digitally printed 1st pbk. version. Cambridge ; New York : Cambridge University Press. *Chemistry and pharmacology of natural products*. ISBN 978-0-521-02017-6. QD325 .H73 2005

ILHAN, Kadir, ARSLAN, Umit et KARABULUT, Ozgur Akgun, 2006. The effect of sodium bicarbonate alone or in combination with a reduced dose of tebuconazole on the control of apple scab. *Crop Protection*. septembre 2006. Vol. 25, n° 9, pp. 963–967. DOI 10.1016/j.cropro.2006.01.002.

JAMAR, Laurent, 2011. *Innovative strategies for the control of apple scab (Venturia inaequalis [Cke.] Wint.) in organic apple production*. PhD Thesis. Université de Liège, Gembloux, Belgium.

JAN, Khan Nadiya, ZARAFSHAN, Khan et SINGH, Sukhcharn, 2017. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*. juin 2017. Vol. 11, n° 2, pp. 423–433. DOI 10.1007/s11694-016-9410-4.

JARIĆ, Snežana, MITROVIĆ, Miroslava et PAVLOVIĆ, Pavle, 2015. Review of Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Study of *Thymus serpyllum* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015. Vol. 2015, pp. 1–10. DOI 10.1155/2015/101978.

JIA, Zhonghua, KOIKE, Kazuo et NIKAIDO, Tamotsu, 1998. Major Triterpenoid Saponins from *Saponaria officinalis*. *Journal of Natural Products*. novembre 1998. Vol. 61, n° 11, pp. 1368-1373. DOI 10.1021/hp980167u.

KEINÄNEN, Markku et JULKUNEN-TIITTO, Riitta, 1998. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography A*. 1998. Vol. 793, n° 2, pp. 370–377.

KÖHL, J, 2007. REPCO 501452 : Replacement of Copper Fungicides in Organic Production of Grapevine and Apple in Europe. Wageningen : Plant Research International.

LATEUR, Marc, 2002. Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. 2002. Vol. 6, n° 2, pp. 67–77.

LYPHOUT, Jean-François, 2015. Purin d'ortie et extraits végétaux: les conseils d'un pro pour un jardin en forme. Paris : Ulmer. ISBN 978-2-84138-764-9. OCLC: 919033797

MACHARDY, William E., 1996. Apple scab: biology, epidemiology, and management. St. Paul, Minn : APS Press. ISBN 978-0-89054-206-4. SB608.A6 M28 1996

MAIREL, François, 2017. Presentation : les extraits végétaux. . La Morinière. 10 janvier 2017.

MARCHAND, Patrice, ISAMBERT, C, JONIS, M, PARVEAUD, Claude-Eric, CHOVELON, Marc, GOMEZ, C, LAMBION, J, ONDET, Sophie-Joy, AVELINE, N, MOLOT, B, BERTHIER, C et FURET, A, 2014. Evaluation des caractéristiques et de l'intérêt agronomique de préparations simples de plantes, pour des productions fruitières, légumières et viticoles économes en intrants. . 2014. N° 34, pp. 83 96.

MARTÍNEZ, Juan A., 2012. Natural fungicides obtained from plants. In : *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. InTech.

MAYR, U., MICHALEK, S., TREUTTER, D. et FEUCHT, W., 1997. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *Journal of Phytopathology*. 1997. Vol. 145, n° 2 3, pp. 69–75.

MERRINGTON, Graham, 2001. The good, the bad and the ugly: copper and arsenic in soils. *Soil Health. The foundation of sustainable agriculture*. Lines-Kelly, R.(Ed). 2001. pp. 20–21.

MIMICA-DUKIC, Neda, SIMIN, Natasa, CVEJIC, Jelena, JOVIN, Emilija, ORCIC, Dejan et BOZIN, Biljana, 2008. Phenolic Compounds in Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.) as Natural Antioxidants. *Molecules*. 17 juillet 2008. Vol. 13, n° 7, pp. 1455 1464. DOI 10.3390/molecules13071455.

MITTAL, Monika, GUPTA, Nomita, PARASHAR, Palak, MEHRA, Varsha et KHATRI, Manisha, 2014. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol. 6, n° 8, pp. 67–72.

MUCHEMBLED, Jérôme, DEWEER, Caroline, SAHMER, Karin et HALAMA, Patrice, 2017. Antifungal activity of essential oils on two *Venturia inaequalis* strains with different sensitivities to tebuconazole. *Environmental Science and Pollution Research* [en ligne]. 2 novembre 2017. [Consulté le 24 août 2018]. DOI 10.1007/s11356-017-0507-z. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-0507-z>

MULHOLLAND, Dulcie A., THUERIG, Barbara, LANGAT, Moses K., TAMM, Lucius, NAWROT, Dorota A., JAMES, Emily E., QAYYUM, Meywish, SHEN, Danni, ENNIS, Kallie, JONES, Amy, HOKKANEN, Heikki, DEMIDOVA, Natalia, IZOTOV, Denis et SCHÄRER, Hans-Jakob, 2017. Efficacy of extracts from eight economically important forestry species against grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*) and identification of active constituents. *Crop Protection*. décembre 2017. Vol. 102, pp. 104-109. DOI 10.1016/j.cropro.2017.08.018.

NAGY, Géza, HOCHBAUM, Tamás, SÁROSI, Szilvia et LADÁNYI, Márta, 2014. *in vitro* and in Planta Activity of Some Essential Oils against *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*

[en ligne]. 3 juin 2014. Vol. 42, n° 1. [Consulté le 24 août 2018]. DOI 10.15835/nbha4219503. Disponible à l'adresse : <http://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9503>

NASSAR, Mahmoud I., GAARA, Ahmed H., EL-GHORAB, Ahmed H., FARRAG, A., SHEN, Hui, HUQ, Enamul et MABRY, Tom J., 2007. Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity. *Revista Latinoamericana de Química*. 2007. Vol. 35, n° 3, pp. 47.

NAVARRO, Jean-Michel, LARRIEU, Jean-François, TOURNANT, Ludovic et ONDET, Sophie-Joy, 2013. Extraits de plantes pour limiter l'utilisation de cuivre et de soufre en Arboriculture Biologique. Journées Substances Naturelles en Protection des Cultures. Paris,. 4 septembre 2013.

ONDET, Sophie-Joy et GOMES, Liliane, 2015. Limitation du développement de tavelure (*Venturia inaequalis*) par aromathérapie : Pré-tests d'huiles essentielles sur pommiers. 2015. GRAB.

OSSIPOV, V., NURMI, K., LOPONEN, J., HAUKIOJA, E. et PIHLAJA, K., 1996. High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *Journal of Chromatography A*. janvier 1996. Vol. 721, n° 1, pp. 59-68. DOI 10.1016/0021-9673(95)00765-2

OTLES, Semih et YALCIN, Buket, 2012. Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal*. 2012. Vol. 2012, pp. 1 12. DOI 10.1100/2012/564367.

PAJOT, Emmanuel et REGNAULT-ROGER, Catherine, 2008. Stimulation des défenses naturelles des plantes et résistance induite : une nouvelle approche phytosanitaire ? In : *Biopesticides d'origine végétale*. 2ème édition. Paris : Éditions Tec & doc. pp. 27. ISBN 978-2-7430-1081-2. OCLC: 403584469

PALLAG, Annamaria, BUNGAU, Simona, TIT, Delia Mirela, JURCA, Tunde, SIRBU, Vasile, HONIGES, Ana et HORHOGEA, Cristina, 2016. Comparative study of polyphenols, flavonoids and chlorophylls in *Equisetum arvense* L. populations. *Revista de Chimie*. 2016. Vol. 67, n° 3, pp. 530–533.

PETIOT, Eric et BERTRAND, Bernard, 2008. Les soins naturels aux arbres. Escalquens (Haute-Garonne) : Ed. de Terran. OCLC: 1014201396

PFEIFFER, B., ALT, S., SCHULZ, C., HEIN, B. et KOLLAR, A., 2004. Investigations on alternative substances for control of apple scab-Results from *Conidia* germinating tests and experiments with plant extracts. In : *Ecofruit-11th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 3rd February to 5th February 2004 at Weinsberg/Germany*. 2004. pp. 101–107.

PHILOGÈNE, Bernard J.R, 2008. Action synergique des composés d'origine végétale. In : *Biopesticides d'origine végétale*. 2ème édition. Paris : Éditions Tec & doc. pp. 10. ISBN 978-2-7430-1081-2. OCLC: 403584469

PUJOL, Jérôme, 2014. Enquête Pratiques phytosanitaires en arboriculture 2012. . 2014. N° n°22.

RAI, Mahendra, CARPINELLA, María Cecilia et WINK, Michael (éd.), 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. In : *Naturally occurring bioactive compounds*. 1st ed. Amsterdam ; Boston : Elsevier. pp. 18. *Advances in phytomedicine*, v. 3. ISBN 978-0-444-52241-2. S587.45 .R35 2006

RAI, Mahendra et CARPINELLA, María Cecilia, 2006. *Naturally occurring bioactive compounds*. 1st ed. Amsterdam ; Boston : Elsevier. *Advances in phytomedicine*, v. 3. ISBN 978-0-444-52241-2. S587.45 .R35 2006

REGNAULT-ROGER, Catherine, PHILOGÈNE, Bernard J. R et VINCENT, Charles, 2008a. *Biopesticides d'origine végétale*. Paris : Éditions Tec & doc. ISBN 978-2-7430-1081-2. OCLC: 403584469

REGNAULT-ROGER, Catherine, PHILOGÈNE, Bernard J. R et VINCENT, Charles, 2008b. *Biopesticides d'origine végétale : bilan et perspectives*. In : *Biopesticides d'origine végétale*. 2ème édition. Paris : Éditions Tec & doc. pp. 24. ISBN 978-2-7430-1081-2. OCLC: 403584469

ROLLINGER, Judith M., SPITALER, Renate, MENZ, Magdalena, MARSCHALL, Klaus, ZELGER, Roland, ELLMERER, Ernst P., SCHNEIDER, Peter et STUPPNER, Hermann, 2006. *Venturia inaequalis* -Inhibiting Diels–Alder Adducts from Morus Root Bark. Journal of Agricultural and Food Chemistry. novembre 2006. Vol. 54, n° 22, pp. 8432–8436. DOI 10.1021/jf061871g.

SAID, A. A. H., OTMANI, I. S., DERFOUFI, Sanae et BENMOUSSA, Adnane, 2015. Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica*). Int J Pharm Pharm Sci. 2015. Vol. 7, n° 10, pp. 8–14.

SANDHU, NAVDEEP SINGH, KAUR, SARABJIT et CHOPRA, DIVNEET, 2010. Equisetum arvense: pharmacology and phytochemistry—a review. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2010. Vol. 3, n° 3, pp. 146–150.

SLATNAR, Ana, STAMPAR, Franci et VEBERIC, Robert, 2012. Influence of bicarbonate salts, used against apple scab, on selected primary and secondary metabolites in apple fruit and leaves. Scientia Horticulturae. août 2012. Vol. 143, pp. 197–204. DOI 10.1016/j.scienta.2012.06.027.

SONMEZDAG, Ahmet Salih, KELEBEK, Hasim et SELLI, Serkan, 2016. Characterization of aroma-active and phenolic profiles of wild thyme (*Thymus serpyllum*) by GC-MS-Olfactometry and LC-ESI-MS/MS. Journal of Food Science and Technology. avril 2016. Vol. 53, n° 4, pp. 1957–1965. DOI 10.1007/s13197-015-2144-1.

SOUFFLET-FRESLON, Vanessa, 2010. Résistance du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*) : Recherche de nouveaux loci et construction de géotypes « prototypes » en vue d'une gestion durable de la résistance. PhD Thesis. Angers, France : Université d'Angers.

THIESZ, REZSO, BALOG, Adalbert, FERENCZ, LÁSZLÓ et ALBERT, JÚLIA, 2007. The effects of plant extracts on apple scab (*Venturia inaequalis* Cooke) under laboratory conditions. Romanian Biotechnological Letters. 2007. Vol. 12, n° 4, pp. 3295.

THUERIG, Barbara, RAMSEYER, Justine, HAMBURGER, Matthias, OBERHÄNSLI, Thomas, POTTERAT, Olivier, SCHÄRER, Hans-Jakob et TAMM, Lucius, 2016. Efficacy of a *Juncus effusus* extract on grapevine and apple plants against *Plasmopara viticola* and *Venturia inaequalis*, and identification of the major active constituent: Fungicidal activity of *Juncus effusus* and dehydroeffusol. Pest Management Science. septembre 2016. Vol. 72, n° 9, pp. 1718–1726. DOI 10.1002/ps.4199.

TREUTTER, D. et FEUCHT, W., 1990. The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. Journal of Horticultural Science. janvier 1990. Vol. 65, n° 5, pp. 511–517. DOI 10.1080/00221589.1990.11516087.

WINK, Michael, 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. In : Naturally occurring bioactive compounds. 1st ed. Amsterdam ; Boston : Elsevier. pp. 18. Advances in phytomedicine, v. 3. ISBN 978-0-444-52241-2. \$587.45 .R35 2006

SITOGRAPHIE

American Phytopathological Society, [sans date]. American Phytopathological Society [en ligne]. [Consulté le 28 août 2018]. Disponible à l'adresse : <https://www.apsnet.org/pages/default.aspx>

IFOAM, Definition of Organic Agriculture, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 28 août 2018]. Disponible à l'adresse : <https://www.ifoam.bio/fr/organic-landmarks/definition-organic-agriculture>

HPLC : chromatographie liquide haute pression, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 28 août 2018]. Disponible à l'adresse : <https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/HPLC.php>

Le Collectif Nouveaux Champs, pour le « Zéro Résidu de pesticides »..., [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 25 août 2018]. Disponible à l'adresse : <http://www.nouveaux-champs.fr/>

Le plan Écophyto, qu'est-ce que c'est ?, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 25 août 2018]. Disponible à l'adresse : <http://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>

AGROCAMPUS
OUEST

- CFR Angers
 CFR Rennes



LA MORINIÈRE



Année universitaire : 2017-2018

Spécialité:

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

PPE-H

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
 de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
 d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Tavelure du pommier : étude comparative d'extraits végétaux pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires dans la lutte contre *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter.

ANNEXES

Par : Charlotte BODART



Soutenu à Angers le 7 septembre 2018

Devant le jury composé de :

Président : Bruno JALOUX

Maître de stage : Anne DUVAL-CHABOUSSOU

Enseignant référent : Pascale GUILLERMIN

Autres membres du jury

François MAIREL, INDENA

Patrice MARCHAND, ITAB

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation



Annexe 1 : Matériel et méthodes pour l'analyse de croissance fongique par néphélométrie (INRA d'Angers)

Dans le cadre de ses travaux l'équipe ResPom de l'INRA d'Angers a réalisé une série de tests de germination de conidies de *V. inaequalis* par néphélométrie (diffractation de la lumière), quelques puits des microplaques de l'appareil de mesure n'étaient pas utilisés et on pu permettre de tester une sélection d'extraits végétaux. La manipulation a malheureusement été contrariée par une contamination bactérienne, et n'a pu offrir aucun résultat. Cette première annexe présente néanmoins le matériels et méthodes relatifs à cette expérimentation.

Présentation de la méthode

Le protocole développé par l'INRA a pour objectif d'évaluer la cinétique de croissance mycélienne de *V. inaequalis*, c'est-à-dire la germination et la croissance des spores en milieu liquide, par néphélométrie. Cette technologie exploite la diffraction de la lumière (à l'inverse d'analyses de densité optique, absorbance de la lumière, inadaptées à l'étude de la croissance mycélienne), pour générer des courbes de croissance mycélienne comparées entre elles et à une culture témoin. Cette méthode est la plus quantitative et la plus fine pour ce type d'analyse, elle permet même de repérer des retards dans les courbes de croissance, la mesure est effectivement maintenue en continu sur une semaine.

Choix et préparation des extraits végétaux

Les places restantes dans la plaque du néphélomètre de l'INRA ont permis de tester l'effet de cinq extraits végétaux : deux décoctions de racine d'ortie à 50g et à 100g de plante sèche par litre d'eau, l'infusion « trois plantes : clou de girofle, feuilles de sureau, serpolet », l'extrait sec d'écorces de chêne et l'extrait sec de pépin de raisin tous deux fournis par INDENA et dilués à 5g par litre d'eau, et une infusion de saponaire à 50g de plante sèche par litre d'eau. La manipulation a démarré à la fin du mois de juin, les extraits à tester ont donc été choisis avant la fin des expérimentations au verger et au laboratoire, ainsi :

- L'infusion de saponaire et les deux extraits secs ont été retenus suite aux premières recherches bibliographiques et aux échanges avec François MAIREL de la société INDENA.
- L'infusion « trois plantes » a été sélectionnée parmi les extraits employés au verger suite aux tendances observées dans l'essai et lors de tests de germination préliminaires (mise au point du protocole).
- Anne DUVAL-CHABOUSSOU a d'autre part émis le souhait de travailler sur la décoction de racine d'ortie à deux concentrations différentes.

Un puits témoin est attribué à chaque produit afin qu'il soit testé seul sans *V. inaequalis*. Un seul témoin suffit lorsqu'il s'agit de tester même produit à une dose différente. Pour la racine d'ortie seule la concentration à 100g de plante par litre a été retenue comme témoin (bien qu'il ait été montré dans la partie précédente qu'une extraction avec plus ou moins de plante dans la même quantité de solvant ne revient pas forcément à varier la dose de produit mais peut en changer la nature). Chaque modalité a fait l'objet de trois répétitions.

Annexe 2 : Liste non exhaustive des composés identifiés dans la littérature pour les plantes utilisées au verger

Composition phytochimique			Sources
Racine d'ortie - <i>Urtica dioica</i>	14-octacosanol		Ganßer et Spiteller 1995
	Lectines	UDA <i>Urtica dioica</i> agglutinin	Bruneton 1999, Said et al 2015
	Composés phénoliques Acides-phénols	acide p-coumarique	Otles et Yalcin 2012, Jan et al 2017
	Composés phénoliques Acides-phénols	acide férulique	Otles et Yalcin 2012
	Composés phénoliques Flavonoïdes	myrcétine	Said et al 2015
	Composés phénoliques Flavonoïdes	quercétine	Said et al 2015
	Composés phénoliques Flavonoïdes	kaempférol	Said et al 2015
	Composés phénoliques Flavonoïdes	rutine	Said et al 2015
	Composés phénoliques Flavonoïdes	kaempférol-3-O-ritinoside	Said et al 2015
	Composés phénoliques Flavonoïdes	isorhamnetine	Said et al 2015
	Composés phénoliques Lignanes	neoolivil	Schöttner et al 1997, Bruneton 1999, Said et al 2015
	Composés phénoliques Lignanes	secoisolaricresinol	Ganßer et Spiteller 1995, Schöttner et al 1997, Bruneton 1999, Said et al 2015, Jan et al 2017
	Composés phénoliques Lignanes	dehydrodiconiferyl alcool	Schöttner et al 1997, Said et al 2015
	Composés phénoliques Lignanes	isolaricresinol	Schöttner et al 1997, Said et al 2015
	Composés phénoliques Lignanes	pinoresinol	Schöttner et al 1997, Said et al 2015
	Composés phénoliques Lignanes	3,4-divanillyltetrahydrofurane	Schöttner et al 1997, Said et al 2015
	Composés phénoliques Coumarines	scopoletine	Said et al 2015, Jan et al 2017
	Terpènes Triterpènes	acide oléanolique	Ganßer et Spiteller 1995
	Terpènes Triterpènes	acide ursolique	Ganßer et Spiteller 1995
	Terpènes Triterpènes	Phytostérols sitostérol-3-O-β-D-glucoside (6'-O-palmitoyl)-sitostérol-3-O-β-D-glucoside	Said et al 2015
	Terpènes Triterpènes	Phytostérols 7β-hydroxysitosterol	Bruneton 1999, Said et al 2015
	Terpènes Triterpènes	Phytostérols 7α-hydroxysitosterol	Bruneton 1999, Said et al 2015
	Terpènes Triterpènes	Phytostérols 7β-hydroxysitosterol-β-D-glucoside	Bruneton 1999, Said et al 2015
	Terpènes Triterpènes	Phytostérols 7α-hydroxysitosterol-β-glucoside, 24R-ethyl-5α-cholestane-3	Said et al 2015
Terpènes Triterpènes	Phytostérols 6α-diol	Said et al 2015	
Terpènes Triterpènes	Phytostérols stigmasterol	Said et al 2015	
Terpènes Triterpènes	Phytostérols campesterol	Said et al 2015	
Terpènes Triterpènes	Phytostérols stigmast-4-en-3-on	Said et al 2015	
Terpènes Triterpènes	Phytostérols hecogenin	Said et al 2015	
Composition phytochimique du chimiotype européen			Sources
Prèle partie aériennes - <i>Equisetum arvense</i> (chimiotype européen)	Composés phénoliques acides phénols acide cinnamique		Bruneton 1999
	Composés phénoliques acides phénols acide dicaféyl-meso-tartique		Bruneton 1999, Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques acides phénols acide mono-caféoyl-tartarique		Bertrand et Andreu 2013, Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques acides phénols acide 5-O-caféylshikimique		Bruneton 1999, Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques acides phénols acide chlorogénique		Bertrand et Andreu 2013
	Composés phénoliques flavonoïdes 3-O-(6-O-malonyl-β-D-glucopyranosyl)-quercétol (30 à 50%)		Bruneton 1999
	Composés phénoliques flavonoïdes 3-O-glucosyl-quercétol		Bruneton 1999
	Composés phénoliques flavonoïdes glycosides de protogenkwanine		Bruneton 1999
	Composés phénoliques flavonoïdes quercetin 3-O-glucoside		Bertrand et Andreu 2013, Sandhu et al 2010, Mimica-Dukic et al 2008
	Composés phénoliques flavonoïdes apigenin 5-O-glucoside		Mimica-Dukic et al 2008
	Composés phénoliques flavonoïdes isoquercitrin		Mimica-Dukic et al 2008
	Composés phénoliques glucoside de styrylç substance qui se comporte comme un flavonoïde		Bruneton 1999
	Composés phénoliques glucoside de styrylç equisetumprone		Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques glucoside phénolique equisetumoside A		Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques glucoside phénolique equisetumoside B		Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques glucoside phénolique equisetumoside C		Sandhu et al 2010
	Composés phénoliques phenolic petrosin onitine		Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012, Gründemann et al 2014
	Composés phénoliques phenolic petrosin oniti-9-O-glucoside		Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012, Gründemann et al 2014
	Terpènes Triterpènes	saponosides équisatonine *	Sandhu et al 2010
	Terpènes Triterpènes	triterpénoïdes isobauerol *	Sandhu et al 2010
	Terpènes Triterpènes	triterpénoïdes taraxerol *	Sandhu et al 2010
	Terpènes Triterpènes	triterpénoïdes germanicol *	Sandhu et al 2010
	Terpènes Triterpènes	triterpénoïdes acide ursolique *	Sandhu et al 2010
	Terpènes Triterpènes	triterpénoïdes acide oléanolique *	Sandhu et al 2010
	Terpènes Triterpènes	triterpénoïdes acide bétulinique *	Sandhu et al 2010
		stérols cholestérol	Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012
		stérols epicholestanol	Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012
		stérols 24-méthylènecholestérol	Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012
		stérols isofucosterol	Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012
		stérols campesterol	Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012
	stérols β-sitostérol	Sandhu et al 2010, Asgarpanah et Roohi 2012	
Alcaloïdes	nicotine	Sandhu et al 2010	
Alcaloïdes	palustrine	Sandhu et al 2010	
Alcaloïdes	palustrinine	Sandhu et al 2010	

Annexe 2 - suite : Liste non exhaustive des composés identifiés dans la littérature pour les plantes utilisées au verger

Composition phytochimique			Sources	
Serpolet parties aériennes - <i>Thymus serpyllum</i>	Lipide	acide gras	ketopentatriacontanoic acid	Aziz 2008
			ketotriacontanol	Aziz 2008
			3-β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid	Aziz 2008
			3-O-β-D-glucopyranosyl-sitosterol	Aziz 2008
			dihydroursonic acid	Aziz 2008
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide caféique	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide rosmarinique	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide férulique	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide chlorogénique	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	luteolin 7-O-glucoside	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	luteolin	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	luteolin 7-O-glucuronide	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	kaempferol O-glucuronide	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	methyl kaempferol O-rutinoside	Sonmezdag et al 2016
	Composés phénoliques	Tanins		Tamert et al 2017
Composés phénoliques	Tanins catéchiques		Tamert et al 2017	
Composés phénoliques	Proanthocyanidols		Tamert et al 2017	
Terpènes	Saponosides		Tamert et al 2017	
Alcaloïdes			Tamert et al 2017	

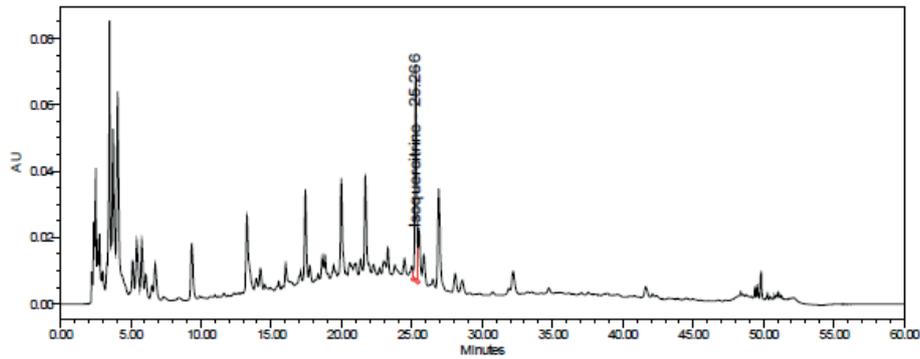
Composition phytochimique			Sources		
Feuilles de sureau noir - <i>Sambucus nigra</i>	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique		D'Abrosca et al 2001, Atkinson et Atkinson 2002	
	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	sambuginin	D'Abrosca et al 2001, Atkinson et Atkinson 2002	
	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	prunasin	D'Abrosca et al 2001, Atkinson et Atkinson 2002	
	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	holocalin	D'Abrosca et al 2001, Atkinson et Atkinson 2002	
	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	6-acetyl holocaline	D'Abrosca et al 2001	
	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	zierin	Atkinson et Atkinson et Atkinson 2002	
	Dérivés d'acides aminés	Hétérosides cyanogénique	4 autres	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Hétéroside phénoliques	acid mandélique	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Hétéroside phénoliques	icaricide F2	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Lignanes	lariciresinol	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Lignanes	neolignanes (3)	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Lignanes	furofuranlignan pinoresinol	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Lignanes	furofuranlignan medioresinol	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	rutin	inconnu	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	quercetin	inconnu	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	quercitin 3-glucoside	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	quercitin 3-O-neo-hesperidoside	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	kampferol 3-O-neohesperidoside	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	kampferol 3-glucoside	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Flavonoïdes	rhamnétin 3-glucoside	D'Abrosca et al 2001	
	Composé phénolique	Tanins		inconnu	
	Terpènes	Triterpènes	α-amyrin palmitates	inconnu	
	Terpènes	Triterpènes	β-amyrin palmitates	inconnu	
	Terpènes	Triterpènes	acide oleanolique	inconnu	
	Terpènes	Triterpènes	acide ursolique	inconnu	
	Terpènes	Triterpènes	stérols	sitosterol	inconnu
	Terpènes	Triterpènes	stérols	stigmasterol	inconnu
	Terpènes	Triterpènes	stérols	campesterol	inconnu

Composition phytochimique			Sources		
CLOU DE GIROFLE - <i>Syzygium aromaticum</i>	Composés phénoliques	Acides phénols	acide gallique 0.78g/ 100g	Cortés-Rojas et al 2014, Mittal et al 2014	
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide caféique	Cortés-Rojas et al 2014	
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide férulique	Cortés-Rojas et al 2014	
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide éllagique	Cortés-Rojas et al 2014	
	Composés phénoliques	Acides phénols	acide salicylique	Cortés-Rojas et al 2014	
	Composés phénoliques	Flavonoïdes		Shailesh 2015, Vizhi et al 2016	
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	catéchines	Vizhi et al 2016	
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	flavonol	quercetin	Nassar et al 2007
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	flavonol	kaempferol	Cortés-Rojas et al 2014, Mittal et al 2014
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	flavonol	rhamnétine	Mittal et al 2014
	Composés phénoliques	Flavonoïdes	flavonol	myricétine	Mittal et al 2014
	Composés phénoliques	Flavonoïdes		tamarixetin 3-O-b-D-glucopyranoside	Nassar et al 2007
	Composés phénoliques	Flavonoïdes		ombuin 3-O-b-D-glucopyranoside	Nassar et al 2007
	Composés phénoliques		flavonol glucosides		Cortés-Rojas et al 2014
	Composés phénoliques	Chromones		eugénitine	Mittal et al 2014
	Composés phénoliques	Chromones		eugénine	Mittal et al 2014
	Composés phénoliques	Coumarines			Vizhi et al 2016
	Composés phénoliques	Tannins			Shailesh 2015, Vizhi et al 2016
	Terpènes	Triterpènes	stérols	campesterol	Mittal et al 2014
	Terpènes	Triterpènes	stérols	stigmasterol	Mittal et al 2014
Terpènes	Triterpènes	saponines		Shailesh 2015, Vizhi et al 2016	
Terpènes	Triterpènes	triterpénoïde	acide oleanolique	Mittal et al 2014	
Terpènes	Triterpènes	triterpénoïde	acide maslinique	Mittal et al 2014	
Terpènes	Triterpènes	stéroïdes		Vizhi et al 2016	
Alcaloïdes				Shailesh 2015, Vizhi et al 2016	
Alcaloïdes			biflorine	Mittal et al 2014	

Annexe 3.a : Résultats de l'analyse HPLC décoction de prêle - Chromatogramme

Sample Name:	Echant 1 Prele	CoA:	
Analytical Method:	ULHAT301	Batch:	
System Name:	TO_LC001	Identification:	decoction de prele cf 155p153
Sample Set Name:	20180531	Column:	ZOR060
Processing Method:	Artichaut_TO_LC001	Balance:	
Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 263nm@4.8nm	Injection Volume:	10.00 ul
Project Name:	CDQ_TO\2018\Produits divers\Moriniere		
Date Acquired:	31/05/2018 20:30:07 CEST	Vial:	1:9 Injection #: 1
Date Processed:	11/06/2018 09:15:09 CEST	Sample Weight:	1.0000 Dilution: 1.00
Acquired By:	helind	Processed By:	helind/Lab Manager

Chromatogram



Calibration Id 2314; Channel Description 2998 Ch1 263nm@4.8nm; Result Id 2384; Processing Method Id 2287; Instrument Method Id 1003

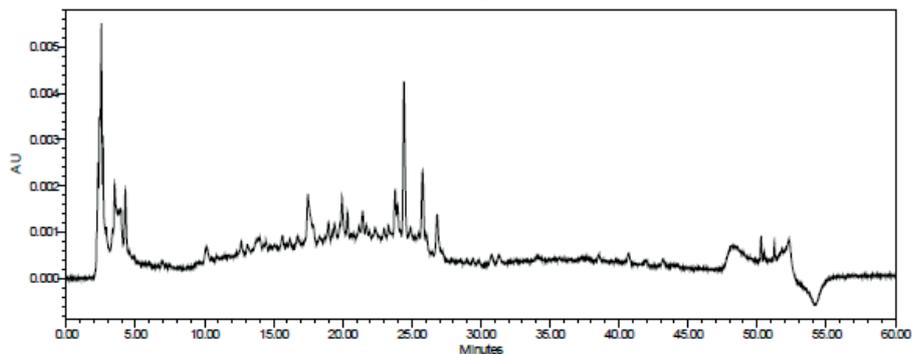
Résultats

Name	Curve Id	Multiplier (compound)	Int Type	RT (min.)	RRT	Area (pA*sec)	Concentration (mg/ml)
1 Isoquercitrine	2323	1.0000	VV	25.266		525995.31	0.019439

Annexe 3.b : Résultats de l'analyse HPLC décoction de racine d'ortie - Chromatogramme

Sample Name:	Echant 3 racine ortie	CoA:	
Analytical Method:	ULHAT301	Batch:	
System Name:	TO_LC001	Identification:	decoction racine ortie cf 155p153
Sample Set Name:	20180531	Column:	ZOR060
Processing Method:	****	Balance:	
Proc. Chnl. Descr.:	****	Injection Volume:	10.00 ul
Project Name:	CDQ_TO\2018\Produits divers\Moriniere		
Date Acquired:	31/05/2018 22:31:54 CEST	Vial:	1:11 Injection #: 1
Date Processed:	****	Sample Weight:	1.0000 Dilution: 1.00
Acquired By:	helind	Processed By:	****

Chromatogram



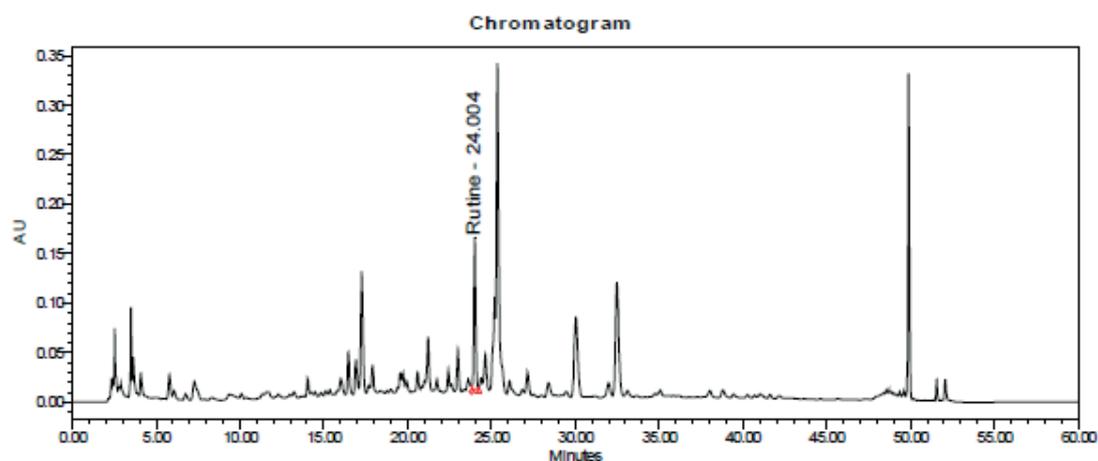
Calibration Id ****; Channel Description 2998 PDA 340.0 nm (2998 (200-400)nm); Result Id ****; Processing Method Id ****; Instrument Method Id 1003

Error Log

All Peaks Table group contains information that doesn't match the data being reported.

Annexe 3.c : Résultats de l'analyse HPLC infusion «trois plantes» - Chromatogramme

Sample Name:	Echant 5 melange plantes	CoA:	
Analytical Method:	ULHAT301	Batch:	
System Name:	TO_LC001	Identification:	decoction mélange plantes cf
Sample Set Name:	20180531	Column:	ZOR060
Processing Method:	Artichaut_TO_LC001	Balance:	
Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 263nm@4.8nm	Injection Volume:	10.00 ul
Project Name:	CDQ_TO\2018\Produits divers\Moriniere		
Date Acquired:	01/06/2018 00:33:38 CEST	Vial:	1:13 Injection #: 1
Date Processed:	11/06/2018 09:19:49 CEST	Sample Weight:	1.0000 Dilution: 1.00
Acquired By:	helind	Processed By:	helind/Lab Manager



Résultats

	Name	Curve Id	Multiplier (compose)	Int Type	RT (min.)	RRT	Area (pA*sec)	Concentration (mg/ml)
1	Rutine	2319	1.0000	Vb	24.004		1136614.89	0.056702

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ANNEXES

ASGARPANAH, Jinous et ROOHI, Elnaz, 2012. Phytochemistry and pharmacological properties of *Equisetum arvense* L. *Journal of Medicinal Plants Research* [en ligne]. 9 juin 2012. Vol. 6, n° 21. [Consulté le 25 août 2018]. DOI 10.5897/JMPR12.234. Disponible à l'adresse : <http://www.academicjournals.org/jmpr/abstracts/abstracts/abstracts2012/9June/Asgarpanah%20and%20Roohi.htm>

ATKINSON, Mark D. et ATKINSON, Elaine, 2002. *Sambucus nigra* L. *Journal of Ecology*. 2002. Vol. 90, n° 5, pp. 895–923.

AZIZ, Shahid, 2008. Studies on the chemical constituents of *Thymus serpyllum*. *Turkish Journal of Chemistry*. 2008. Vol. 32, n° 5, pp. 605–614.

BERTRAND, Cédric et ANDREU, Vanessa, 2013. Caractéristiques et intérêts des préparations à base de plantes. *Journées Substances Naturelles en Protection des Cultures*. Paris. 4 septembre 2013.

BRUNETON, Jean, 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3. éd. rev. et augm. Paris : Ed. Tec & doc-Lavoisier [u.a.]. ISBN 978-2-7430-0315-9. OCLC: 247277604

CORTÉS-ROJAS, Diego Francisco, DE SOUZA, Claudia Regina Fernandes et OLIVEIRA, Wanderley Pereira, 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. février 2014. Vol. 4, n° 2, pp. 90-96. DOI 10.1016/S2221-1691(14)60215-X.

D'ABROSCA, Brigida, DELLAGRECA, Marina, FIORENTINO, Antonio, MONACO, Pietro, PREVITERA, Lucio, SIMONET, Ana M. et ZARRELLI, Armando, 2001. Potential allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry*. 2001. Vol. 58, n° 7, pp. 1073–1081.

GANßER, Dietmar et SPITELLER, Gerhard, 1995. Aromatase Inhibitors from *Urtica dioica* Roots. *Planta Medica*. avril 1995. Vol. 61, n° 2, pp. 138-140. DOI 10.1055/s-2006-958033.

GRÜNDEMANN, Carsten, LENGEN, Karin, SAUER, Barbara, GARCIA-KÄUFER, Manuel, ZEHL, Martin et HUBER, Roman, 2014. *Equisetum arvense* (common horsetail) modulates the function of inflammatory immunocompetent cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014. Vol. 14, n° 1, pp. 283.

JAN, Khan Nadiya, ZARAFSHAN, Khan et SINGH, Sukhcharn, 2017. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*. juin 2017. Vol. 11, n° 2, pp. 423-433. DOI 10.1007/s11694-016-9410-4.

MIMICA-DUKIC, Neda, SIMIN, Natasa, CVEJIC, Jelena, JOVIN, Emilija, ORCIC, Dejan et BOZIN, Biljana, 2008. Phenolic Compounds in Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.) as Natural Antioxidants. *Molecules*. 17 juillet 2008. Vol. 13, n° 7, pp. 1455-1464. DOI 10.3390/molecules13071455.

MITTAL, Monika, GUPTA, Nomita, PARASHAR, Palak, MEHRA, Varsha et KHATRI, Manisha, 2014. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol. 6, n° 8, pp. 67–72.

NASSAR, Mahmoud I., GAARA, Ahmed H., EL-GHORAB, Ahmed H., FARRAG, A., SHEN, Hui, HUQ, Enamul et MABRY, Tom J., 2007. Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity. *Revista Latinoamericana de Química*. 2007. Vol. 35, n° 3, pp. 47.

OTLES, Semih et YALCIN, Buket, 2012. Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. The Scientific World Journal. 2012. Vol. 2012, pp. 1-12. DOI 10.1100/2012/564367.

SAID, A. A. H., OTMANI, I. S., DERFOUFI, Sanae et BENMOUSSA, Adnane, 2015. Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica*). Int J Pharm Pharm Sci. 2015. Vol. 7, n° 10, pp. 8–14.

SANDHU, NAVDEEP SINGH, KAUR, SARABJIT et CHOPRA, DIVNEET, 2010. Equisetum arvense: pharmacology and phytochemistry—a review. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2010. Vol. 3, n° 3, pp. 146–150.

SCHÖTTNER, Matthias, GANßER, Dietmar et SPITELLER, Gerhard, 1997. Lignans from the Roots of *Urtica dioica* and their Metabolites Bind to Human Sex Hormone Binding Globulin (SHBG). Planta Medica. décembre 1997. Vol. 63, n° 6, pp. 529-532. DOI 10.1055/s-2006-957756.

SHAILESH, 2015. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Syzygium aromaticum*, *Elettaria cardamomum* and *Piper nigrum* extracts. . 2015. pp. 85-89.

TAMERT, A., LATRECHE, A. et AOUAD, L., 2017. Criblage phytochimique et activité antimicrobienne des extraits de *Thymus serpyllum* et de *Thymus vulgaris* du mont de Tessala (Algérie occidentale). Phytothérapie. décembre 2017. Vol. 15, n° 6, pp. 384-394. DOI 10.1007/s10298-017-1132-1.

VIZHI, Duraisamy Kayal, IRULANDI, Kokkaiah, MEHALINGAM, Palanichamy et KUMAR, Natarajan Nirmal, 2016. *in vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of fruits of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry-An important medicinal Plant. . 2016.

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : PPE-H Enseignant référent : Pascale GUILLERMIN
Auteur(s) : Charlotte BODART Date de naissance* : 09/11/1994	Organisme d'accueil : La Morinière - Station d'Etudes et d'Expérimentations Fruitières Nord Loire
Nb pages : 35 Annexe(s) : 3	Adresse : La Morinière, 37800 Saint-Epain
Année de soutenance : 2018	Maître de stage : Anne DUVAL-CHABOUSSOU
Titre français Tavelure du pommier : étude comparative d'extraits végétaux pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires dans la lutte contre <i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) Winter. Titre anglais Apple scab : comparative study of plant extracts in order to reduce the use of phytosanitary products in the fight against <i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) Winter.	

Résumé : Cette étude s'inscrit dans l'enjeu actuel de réduction de l'utilisation des intrants phytosanitaires en agriculture, et plus spécialement au regard de la gestion de la tavelure du pommier, particulièrement problématique et consommatrice en fongicides. Les travaux réalisés ont cherché à déterminer l'efficacité de différents extraits végétaux au regard, à la fois du développement de la tavelure en conditions *in vivo* au verger, et leur capacité à limiter la germination de spores de *V. inaequalis in vitro*. La composition en métabolites secondaires des extraits végétaux et le rôle de ceux-ci dans la défense des plantes face aux agressions fongiques, notamment du pommier à *V. inaequalis*, ont occupé une place prépondérante au sein de cette étude, faisant notamment l'objet de recherches bibliographiques et d'analyses chimiques. Certains résultats issus de l'expérimentation au verger montrent l'efficacité significativement plus importante d'un traitement contenant une infusion de clous de girofle, feuilles de sureau et serpolet, par rapport au témoin et aux produits de référence. L'étude n'a néanmoins à ce stade pas permis de conclure quant au potentiel des extraits végétaux à diminuer l'emploi des intrants phytosanitaire dans la lutte contre la tavelure du pommier. Dans cette optique une nouvelle démarche générale est proposée en vue de reconduire l'étude. Celle-ci suggère que le mode d'action des extraits végétaux devrait être appréhendé et compris en amont de l'expérimentation au verger. La caractérisation chimique des extraits mériterait ainsi de faire l'objet de travaux complémentaires, et la méthode d'évaluation des capacités antifongiques des extraits sur spore de *V. inaequalis in vitro*, peu fiable, devrait être révisée et complétée avec des outils permettant de tester leurs propriétés d'activation de la défense des plantes.

Abstract : This study is part of the current issue looking for the reduction in the use of phytosanitary products in agriculture, and more specifically when managing apple scab which is particularly challenging and fungicide consuming. The work achieved aimed to identify the efficiency of several plant extracts looking towards, in one hand apple scab progression *in vivo* in the orchard, in the other hand their ability to lessen *V. inaequalis* spore germination *in vitro*. Secondary metabolites composition of the plant extracts, and the role played by those in plants defences against fungal attacks, including apple trees towards *V. inaequalis*, took a prominent position within this study, and were then subject to bibliographical research and chemical analysis. Some data stemming from the field experiment show the efficiency significantly higher of a treatment containing an infusion of clove, elder leaves and thyme infusion in comparison with the control and standard treatments. The was nonetheless not able at this point to conclude regarding the capacity of plant extracts to drive the use of phytosanitary products down in managing apple scab. With this in mind, a new general approach is put forward to reiterate the study another way. This one suggest that the way plant extracts operate should be better grasped and understood upstream the field experiment. Chemical identification of the extracts would deserve to be subject to additional work, and the valuation method of the extracts antifungal properties against *V. inaequalis in vitro*, quite unreliable, should be redesigned and supplemented with tools allowing to test their properties in activating plants defences.

Mots-clés : tavelure du pommier, extraits végétaux, réduction des produits phytosanitaires, antifongique, stimulateur de défense des plantes, métabolite secondaire, phytochimie, saponosides

Key Words : apple scab, plant extracts, reducing phytosanitary products, antifungal, plant defences activator, secondary metabolite, phytochemistry, saponins

*Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires