

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE BLIDA I

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT BIOTECHNOLOGIQUE

Mémoire vue de l'obtention
du Diplôme de Master 2

Spécialité : Biologies des Interactions Plantes Microorganismes

**Evaluation antifongique *in vitro* de *Trichoderma sp*
sur quelques champignons phytopathogène**

Présenter par :

BOUCHEKOUK Meriem

Devant le jury composé de :

Président de jury : **BENCHABANE.D**

MCA

U.Blida 1.

Promoteur: **AMMAD.F**

MAA

U.Blida 1.

Examinatrice : **BENSAID.F**

MAA

U.Blida 1.

Examinatrice : **BRAHIMI.L**

MAB

U.Blida 1.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014-2015

Remerciement

Je remercie tout d'abord notre vénéré ALLAH, le tout puissant, à qui nous devons le tout.

Il m'est agréable d'exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui, à titres divers m'ont apporté leur aide pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon responsable de recherche Mme. AMMAD F, professeur à l'université de Blida-1, pour avoir dirigé mes travaux de recherche en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant beaucoup de son temps précieux, à qui je dois exprimer mon respect et ma reconnaissance.

Mes remerciements vont aussi au Mr BENCHABANE M. responsable de ma spécialité.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et mon profond respect reconnaissance à Mme. BENCHABANE D, pour l'honneur qu'elle me fait en présidant le jury de ce mémoire.

Mes vifs remerciements à Mme. BENSAID F. pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes sincères remerciements vont à Mme. BRAHIMI L. pour avoir accepté d'examiner ce modeste.

Je remercie cordialement à Mlle. FADIL Djamila, ingénieur de laboratoire de Mycologie, pour ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie mon Papa, qui m'a suivie et toujours soutenu dans mon parcours et qui a mis à ma disponibilité tous les moyens requis pour mon éducation et mon instruction.

Résumé

Cette étude a pour objectifs d'évaluer l'efficacité fongicide *in vitro* de *Trichoderma* sp. vis-à-vis un agent pathogène impliqué dans le dépérissement de la vigne, des arbres fruitier et des plants forestiers.

Trichoderma sp. s'est révélés active quantitativement et qualitativement sur les deux isolats des pathogènes étudiés. Les tests du pouvoir antifongique de *Trichoderma* sp. par la technique ensemencement en masse ont montré une efficacité très significative avec des pourcentages d'inhibition qui dépassent 90%. Par contre les essais de confrontation directe, *Botryosphaeria* sp. et *Trichoderma* sp. ont révélé que ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne des deux isolats testés de plus de 28% pour le par rapport au témoin et ce après cinq jours d'incubation à 25 °C. De plus, au delà de cette période et au terme de cinq jours, le *Trichoderma* envahit les colonies de *Botryosphaeria* sp. pour le mode ensemencement en masse. Des résultats intéressants ont également été obtenus avec l'augmentation des concentrations de ce champignon dans le milieu.

Mots-clés. *Botryosphaeria*, Confrontation directe, ensemencement en masse, *Trichoderma*

Abstract

This study aims to evaluate the efficacy in vitro fungicidal *Trichoderma sp.* In other hand a pathogen implicated in wasting of vines, fruit trees and forest plants.

Trichoderma sp. has revealed active quantitatively and qualitatively on both isolates studied pathogens. The tests of antifungal potency of *Trichoderma sp.* by mass seeding technique showed a very significant efficacy with percentages of inhibition exceeding 90%. For direct confrontation against the tests, *Botryosphaeria sp.* and *Trichoderma sp.* revealed that he was able to inhibit mycelial growth of two isolates tested over 28% for over control and that after five days incubation at 25 ° C. Moreover, beyond this period, and after five days, the *Trichoderma* invades colonies *Botryosphaeria sp.* for mass seeding mode. We got interesting results obtained with increasing concentrations of the fungus in the environment.

Keywords. *Botryosphaeria*, direct confrontation, mass seeding, *Trichoderma*

ملخص

وتهدف هذه الدراسة إلى تقييم فعالية مبيد الفطريات الترايكوديرما في المختبر. وجها لوجه عامل ممرض مهلك للكروم وأشجار الفاكهة ونباتات الغابية.

الترايكوديرما. كشفت نشاطا من الناحية الكمية والنوعية على حد سواء في معزلين لمسببات الأمراض التي شملتها الدراسة. اختبارات قوة مضادة للفطور من الترايكوديرما. بواسطة تقنية البذر الجماعية أظهرت فعالية كبيرة جدا مع نسبة تثبيط تتجاوز 90%. مقابل المواجهة المباشرة، البوتريوسفاريا. والترايكوديرما. وكشف أنه كان قادرا على كبح نمو فطر اثنين من المعازل المختبرة أكثر من 28% عن السيطرة وذلك بعد خمسة أيام الحضانة عند 25 درجة مئوية. وعلاوة على ذلك، بعد هذه الفترة، وبعد خمسة أيام، والترايكوديرما يغزو المستعمرات البوتريوسفاريا. بوضع البذر الشامل. كما تم الحصول على نتائج مثيرة للاهتمام مع زيادة تركيزات الفطريات في البيئة.

كلمات مفتاح:

البوتريوسفاريا، المواجهة المباشرة، البذر الجماعية، الترايكوديرما.

Table des matières :

Remerciement.....	I
Résumer.....	II
Abstract	III
ملخص.....	IV
Tables des matières.....	V
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Abréviation	IX
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I-Généralité sur ma vigne.....	2
I-1 Historique de la vigne.....	2
I-2 Données générales sur la vigne (<i>Vitis vinifera</i> ..).....	2
II-Importance dans la filière viticole.....	3
II-1 Dans le monde.....	3
II-2 En Algérie.....	4
II-2 Les maladies du bois de la vigne.....	6
III-1 La maladie de Petri.....	7
III-2 La maladie de pied noir	7
III-3 L'Eutypiose	8
III-4 L'Esca.....	10
III-5 Black Dead Arm (Le BDA).....	12
IV-Facteurs favorisent le dépérissement	13
IV-1 Climat et sol.....	14
IV-2 Cépages et portes greffes	14
IV-3 Mode de conduite	15
IV-4 Réceptivité des ceps.....	15
V-Méthode de lutte.....	15
V-1 Lutte chimique.....	16

V-2 Mesures préventives	16
V-3 Lutte biologique.....	17
VI-Généralité sur le genre <i>Trichoderma</i>	19
VI-1 Historique et taxonomie	19
VI-2 Morphologie.....	20
VI-3 Ecologie.....	21
VI-4 Interaction <i>Trichoderma</i> .sp – agent pathogène.....	21
VI-4-1 <i>Trichoderma</i> .sp , agent de lutte biologique.....	21
VI-4-2 Mode d’action	22
VI-4-2-1 Mycoparasitisme et enzymes lytiques.....	22
VI-4-2-2 Compétition pour les nutriments et l’espace.....	23
 CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	 24
I-Introduction.....	24
II-Prélèvement des échantillons de bois.....	24
III-Diagnostic au laboratoire.....	24
III-1. Isolement et recherche des agents causals.....	24
III-2. Observation et purification des cultures	25
III-3. Etude microbiologique.....	25
IV-Étude <i>in vitro</i> du pouvoir antifongique de <i>Trichoderma</i>	25
IV-1. Souche fongique.....	25
IV-2. Maintien de la souche fongique.....	25
V-Activité antifongique.....	26
VI-Analyse statistique	27
 CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	 28
I-Etude étiologique	28
1. Caractérisation et identification des agents fongique.....	28
a-Caractérisation morphologique et micro-morphologique de <i>Trichoderma</i>	28
2. Evaluation de l’activité fongique.....	28
3. Analyse comparative de l’activité fongique de <i>Trichoderma</i> sp.....	31
3.1. Etude comparative de confrontation directe de <i>Trichoderma</i> sp avec deux isolats fongiques.....	31
3.2 Etude comparative d’ensemencement en masse de <i>Trichoderma</i> sp avec les deux isolats fongiques.....	33

3.3 Etude comparative entre les deux techniques de traitement (confrontation directe et ensemencement en mass.....	36
II-DISCUSSIONS.....	38
Conclusion	42
Références	
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau I. 1 : Situation sur l'évolution de la viticulture en Algérie.....	5
Tableau III.2 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de <i>Trichoderma</i> sp. vis à vis des isolats fongiques par la technique de confrontation directe	29
Tableau III.3 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de <i>Trichoderma</i> sp. vis à vis des isolats fongiques par la technique d'ensemencement en masse	29
Tableau III.4 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet de temps sur la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria</i> avec la technique de confrontation directe	31
Tableau III.5 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet de temps sur la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria</i>	32
Tableau III.6 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet des doses sur la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria</i> avec la technique d'ensemencement en masse.....	34
Tableau III.7 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet des doses sur la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria</i>	35
Tableau III.8 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet des deux traitements sur la croissance mycélienne de <i>Botryosphaeria</i>	36

Liste des figures

Figure I.1 : Cycle biologique d' <i>Eutypa lata</i>	8
Figure I.1 : Cycle biologique d' <i>Eutypa lata</i>	9
Figure I.3 : Une nécrose en forme de V due à <i>Eutypa lata</i>	9
Figure I.4 : Photos représentant la forme dite lente et la forme apoplectique	11
Figure I.5 : Symptômes foliaires du black dead arm sur Merlot	12
Figure III.6 : Isolats de <i>Trichoderma</i> sur le milieu PDA	28
Figure III.7 : Pouvoir antifongique de <i>Trichoderma</i> sp. vis à vis des isolats fongiques par l'inhibition de la croissance mycélienne.....	30
Figure III.8 : Étude temporelle comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats phytopathogènes selon la technique de confrontation sous l'effet de <i>Trichoderma</i> sp.....	32
Figure III.9 : Étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats phytopathogènes selon la technique de confrontation	33
Figure III.10 : Étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats phytopathogènes selon la technique d'ensemencement en masse sous l'effet de <i>Trichoderma</i>	34
Figure III.11 : Étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches phytopathogènes selon la technique d'ensemencement en masse	35
Figure III.12 : Etude comparative entre confrontation directe et ensemencement en masse.....	36

Abréviations

% : Pourcentage

°C : Degrée Celsius

BDA: Black Dead Arm

Bo : *Botryosphaeriaceae*

cm: centimètre

CPM : la superficie du champ de pied mère est comptabilisée dans le total vignoble

D: Dose

D_C : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité

D_t : Le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon traité

G.L.M: General Linear Model

Ha : Hectare

MC : Moyen de croissance

ml : millilitre

MSA: Mutualité Sociale Agricole

nd : non donné

OIV : Organisation internationale de la vigne

Pal : *Phaeoacremonium aleophilum*

Pch : *Phaeomoniella chlamydospora*

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: potentiel d'Hydrogène

PI : Pourcentage d'inhibition

PI : Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés

PNDA : plan national de développement Agricole

Introduction

INTRODUCTION

La Vigne est l'espèce végétale la plus cultivée dans le monde. Son importance économique considérable se situe au niveau de la production des fruits, le raisin, commercialisé comme raisin de table et jus de fruit. La viticulture occupe environ 8 millions d'hectares dans le monde et permet de produire 300 millions d'hectolitres de vin. La majorité des Vignes cultivées dans le monde est regroupée en Europe (62,7 % du vignoble mondial) et notamment en France, Italie et en Espagne. (Chloé, 2006)

La Vigne est constamment soumise à de nombreux stress qu'ils soient liés aux conditions climatiques, aux pratiques culturales, à des carences en minéraux et à des bioagresseurs (agents pathogènes). Les contraintes phytosanitaires menacent continuellement les vignobles et conduisent les viticulteurs à utiliser de larges quantités de produits chimiques.

En une trentaine d'années, les maladies du bois, d'origine fongique, sont devenues une préoccupation majeure pour les viticulteurs. Non seulement elles sont à l'origine de pertes de rendement et de qualité mais surtout elles causent une mortalité importante. L'impact économique des maladies du bois est donc réel pour les viticulteurs, or il n'existe pas de solution curative à proprement parler.

Ces dernières années, les efforts fournis en matière de recherche sur les maladies du bois de la vigne ont été considérables : étude des agents pathogènes, des modes d'infection, des relations hôtes-parasites et des méthodes de lutte. Néanmoins les interrogations restent nombreuses. Si l'existence de cépages plus ou moins sensibles aux maladies du bois est un fait couramment observé, l'explication de ces différentes sensibilités n'a jamais réellement été apportée. Le contrôle des maladies du bois reste aujourd'hui une problématique à mettre en œuvre, tant au vignoble qu'en pépinière viticole, depuis le retrait de l'homologation de l'arsénite de soude du marché Européen en 2001. Cependant, depuis quelques années, chimistes, physiologistes, biochimistes, toxicologues et spécialistes de la protection des végétaux unissent leurs efforts dans la recherche de nouvelles molécules d'origine végétale et microbienne susceptibles d'assurer une lutte efficace et durable contre ces bioagresseurs.

En raison de l'absence de moyens de lutte efficaces contre la flore fongique associée au dépérissement de la vigne un essai de lutte a été proposé par l'usage des traitements biologiques de nature microbien, afin de mettre en évidence l'activité antifongique *in vitro* de *Trichoderma* sur quelques champignons phytopathogène impliqué dans le dépérissement de la vigne.

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Généralité sur la vigne :

I-1. Historique de la vigne :

L'histoire de la Vigne accompagne depuis longtemps celle de l'Homme. Les premières traces de ceps de vigne, découvertes dans l'actuelle Géorgie, datent de plus de 7000 ans (Rowley *et al.*, 2003). A partir de la Géorgie, la culture de la Vigne se serait répandue dans tous les pays tempérés depuis l'Inde jusqu'à l'Occident Européen (Enjalbert, 1975). Les premières fresques représentant des procédés de vinification ont été retrouvées en Egypte dans des lieux de sépulture datant de 3000 ans avant JC. La Grèce, en partie grâce à ses contacts avec l'Egypte, adopta la culture de la Vigne (Johnson, 1990).

A la fin du XIX^{ème} siècle, la Vigne disparaît presque totalement des vignobles français et européens. Ce désastre fut causé par l'importation accidentelle, en provenance d'Amérique du Nord, d'un minuscule puceron, *Phylloxera vastatrix*, qui se nourrit des racines de la Vigne.

I-2. Données générales sur la vigne (*Vitis vinifera* .L)

La Vigne (*Vitis vinifera*) est une plante grimpante pérenne à croissance indéterminée, capable de se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage (Gary *et al.*, 2003). Elle est cultivée pour ses fruits charnus: La constitution d'un vignoble nécessite du temps: il faut attendre 3 ans pour obtenir les premiers fruits, 10 à 12 ans pour avoir un rendement significatif et 25 ans pour arriver à la pleine production. La qualité organoleptique augmente avec l'âge du cep.

La vigne cultivée, *Vitis vinifera*, ainsi que les espèces du genre *Vitis*, sont des plantes angiospermes dicotylédones de la famille des Vitacées, appartient à l'ordre des Rhamnals. Cette famille comporte 19 genres (Galet, 2000), le genre *Vitis* contient deux sous-genres, *Muscadinia* et *Euvitis*, qui présentent des caractères anatomiques, morphologiques et cytologiques distincts ; seul le genre *Vitis* contient les espèces pour la production viticole (Huglin et scheider, 1998).

La Vigne effectue au cours de son développement deux cycles en concurrence trophique. Le cycle végétatif assure la pérennité du cep grâce au développement de l'appareil végétatif et le cycle reproducteur permet la formation des fleurs, puis des fruits (Coombe et dry, 1988).

Le cycle végétatif de la vigne se déroule sur un an selon différents stades phénologiques définis par (Baggiolini, 1952) et (Eichhorn et Lorenz, 1977). Après une période de dormance, les pleurs montrant à la reprise de l'activité de la vigne. Le débourrement, des bourgeons formés l'année précédente, montrant le démarrage de la croissance des rameaux et des futurs organes reproducteurs. La floraison a lieu vers le mois de juin, suivie par la nouaison: après fécondation les ovaires commencent à grossir. Vers le mois d'août la véraison a lieu, suivie le stade de maturation des fruits et la date de vendange marque la fin du cycle. La fin de septembre les tiges herbacées stoppent leur croissance et prennent un aspect brunâtre, marquant le stade aoutement, caractérisé par la lignification et l'accumulation des réserves (amidon, sucre) au niveau du bois et des racines, cette accumulation de réserves dans les futurs bois se poursuit jusqu'au mois de novembre qui marque le début d'une nouvelle période de repos végétatif. Les réserves ainsi accumulées permettront la reprise du cycle végétatif l'année suivante.

II- Importance de la filière viticole

II-1. Dans le monde

La Vigne couvre dans le monde aujourd'hui près de sept millions d'hectares et continue de s'étendre à raison d'un accroissement continu de la consommation, de 4,5% en moyenne au cours des dix dernières années (2001-2011). La majorité des surfaces viticoles mondiales sont situées en Europe (59%), les superficies sont concentrées surtout en Espagne, 1 032 000 ha, en France : 807 000 ha et en Italie, 776 000 ha le reste étant réparti entre l'Asie (22%), l'Amérique (12,5%) et l'Afrique (4,9%) (OIV, 2011). Les statistiques de l'OIV font ressortir une nette diminution des surfaces mondiales de vigne depuis une dizaine d'années: la baisse cumulée au cours des dix dernières années s'est élevée à 262.000 ha. En 2011, le vignoble mondial a atteint son niveau le plus bas des dix dernières années avec 7,58 millions ha. Malgré la campagne d'arrachage mise en place par la Commission européenne, il est à signaler dans ce laps de temps, la belle progression du vignoble chinois qui a presque doublé dans la dernière décennie (+ 89 %) et de la Nouvelle-Zélande, qui a presque triplé sa surface entre 2000 et 2011 (de 14 à 37.000 ha). La production annuelle mondiale de vin est estimée à 265 millions d'hl. L'Europe, avec environ 74% de cette production occupe une place prépondérante. Cependant, l'augmentation régulière de la production des pays dits du Nouveau Monde (U.S.A., Argentine, Chili, Australie et Afrique du Sud) est à signaler.

II-2. En Algérie

La superficie du vignoble Algérien est d'environ 73.400 ha, les grandes régions viticoles sont situées l'ouest du pays. Depuis l'indépendance, le secteur viticole algérien a connu des bouleversements profonds engendrés par des mutations d'ordre politique et socio-économique. Les surfaces cultivées ont considérablement diminué suite à des arrachages et à la faiblesse de production.

Ces dernières années la viticulture a pris une place importante dans la nouvelle vision du développement du secteur agricole, à travers le plan national de développement Agricole (P.N.D.A.), qui a été initié à partir de l'an 2000, qui vise à relancer cette culture en Algérie, notamment dans les régions à vocation viticole et montagneuse avec toutes les retombées positives en matière de protection des sols, de production et de création d'emplois. Pour ce faire, les pouvoirs publics ont mis en place un ensemble de mesures d'encouragement visant justement la réhabilitation de cette culture et son intensification.

Selon les données obtenues auprès des services de production du Ministère de l'Agriculture et du Développement rural (2014) (Tableau I.1), il apparaît clairement un regain d'intérêt envers cette culture. En effet, les surfaces viticoles progressent d'année en année en s'orientant plus vers les raisins de table avec une diversification variétale. Une nette augmentation des superficies viticoles est enregistrée pendant la période qui s'étale de 1998 au 2005, ces dernières ont presque doublées, la superficie viticole a atteint 100.202 ha en 2005. En dépit des encouragements des viticulteurs à travers le programme P.N.D.A., l'extension du vignoble algérien est marquante, mais le potentiel productif reste tributaire de conduites culturales. En observant les rendements réalisés chaque année, il en ressort une certaine faiblesse dans la gestion de la production. En plus des difficultés inhérentes aux aspects phytotechniques (choix de cultivars, technique de conduite...), l'aspect phytosanitaire contribue dans cette régression de la production à plus d'un titre et en termes de superficie notée en 2006 jusqu'à ce jour.

En effet, la vigne est sensible à de nombreuses maladies dues à divers agents pathogènes: virus, phytoplasmes, bactéries, insectes et champignons. Néanmoins, la majorité des pesticides utilisés en viticulture sont des fongicides. En moyenne, 7 à 19 traitements sont appliqués par parcelle au cours d'une saison. Les principales maladies visées par ces traitements sont le mildiou et l'oïdium et dans une moindre mesure la pourriture grise qui sont respectivement dues aux agents *Plasmopara viticola*, *Erysiphe*

necator et *Botrytis cinerea*. Ces affections atteignent les organes herbacés de la vigne et peuvent être maîtrisées en conjuguant une prophylaxie et un usage des traitements chimiques. Cependant, depuis une vingtaine d'années des maladies cryptogamiques touchant les vaisseaux conducteurs de sève de la vigne ont émergés.

Tableau I. 1 : Situation sur l'évolution de la viticulture en Algérie
(Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, 2014)

	2000			2001			2002		
	Sup. ha	Prod. qx	Rend. qx/ha	Sup. ha	Prod. qx	Rend. qx/ha	Sup. ha	Prod. qx	Rend. qx/ha
Vignoble	58 833	2 038 010	34,6	68 540	1 961 590	29,3	79 990	2 343 970	29,3
Vigne de table	34 150	1 621 540	54,0	38 260	1 612 580	53,1	41 860	1 881 390	59,2
Vigne de cuve	24 570	414 630	19,9	30 190	347 570	16,6	38 010	458 510	20,6
Vigne à raisin sec	110	1 840	16,7	90	1 440	16,0	120	4 070	37,0
	2003			2004			2005		
Vignoble	94 025	2 779 680	29,56	97 696	2 839 000	45,4	100 202	3 340 210	48,0
Vigne de table	45 380	619 140	24,1	47 070	616 000	23,4	47 668	727 090	22,3
Vigne de cuve	48 520	2 157 440	62,3	50 465	2 220 550	61,6	52 406	2 610 280	70,8
Vigne à raisin sec	125	3 100	27,0	161	2 450	20,2	128	2 840	23,9
	2006			2007			2008		
Vignoble	97 063	3 980 180	52,9	91 930	2 449 990	31,9	86 665	4 019 915	54,5
Vigne de table	44 170	807 020	22,8	38 044	406 860	11,8	34 332	621 557	19,6
Vigne de cuve	52 769	3 170 600	80,0	53 772	2 040 470	48,3	52 224	3 396 188	81,1
Vigne à raisin sec	124	2 560	22,7	114	2 660	24,9	109	2 170	22,4
	2009			2010			2011		
Vignoble	82 184	4 925 252	63,8	79.855	5.604.000	70.2	77.461	4.025.950	51.97
Vigne de table	31 051	728 450	27,9	50.482	4.743.285	114.3	49.338	3.499.150	77.7

Vigne de cuve	51 029	4 194 537	97,7	29.373	860.715	29.3	28.049	525.120	18.72
Vigne à raisin sec	104	2 265	23,4	75	1620	21.6	74	1680	22.70
	2012			2013			2014		
Vignoble	74.079	5.431.690	73.3	73.35	5.707.540	77.81	nd	nd	nd
Vigne de table	47.224	4.432.566	111	47.02	4.829.497	102.70	nd	nd	nd
Vigne de cuve	26.827	697.404	25.9	26.29	878.043	33.39	nd	nd	nd
Vigne à raisin sec	58	1720	29.7	38	860	22.63	nd	nd	nd

nd : non donné

CPM : la superficie du champ de pied mère est comptabilisée dans le total vignoble

III- Les maladies du bois de la vigne

Les maladies du bois sont définies comme étant des maladies causées ou associant des champignons pathogènes des parties aériennes, ligneuses et pérennes de la vigne : tronc et bras ou cordons. En cela, elles se distinguent des maladies racinaires, foliaires et des organes fructifères. Elles regroupent plusieurs maladies, certaines affectant les jeunes vignes d'autres les vignes plus âgées. Ainsi les maladies nommées : Pied noir, maladie de Petri, Verticilliose et Fusariose touchent les jeunes plantes (1-5 ans) en pépinière ou au vignoble. Les dépérissements liés à *Botryosphaeria*, l'esca et l'eutypiose sont généralement décrits sur les vignes plus âgées. Ces dernières sont responsables de dépérissements importants dans de nombreux vignobles de par le monde, diminuant la longévité d'une plantation de vigne et affectant la qualité des raisins produits sur vignes malades (Lorrain *et al.*, 2012). Selon la maladie considérée, les méthodes de lutte préconisées peuvent varier, cependant aux vues des caractéristiques de ces pathosystèmes, les méthodes directes n'ont souvent qu'un effet partiel, les méthodes prophylactiques restant parfois les seules préconisées. Dans cette partie seront développées les connaissances actuelles concernant la microflore fongique pathogène associée aux maladies du bois affectant les plantes jeunes et les plantes âgées et les principales méthodes de lutte.

III-1. La maladie de Petri

Cette maladie, associée à deux champignons Ascomycètes *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) et *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), affecte les ceps de vigne âgés de 1 à 10 ans (Del Rio Conesa, 2002; Fourie et Halleen, 2002) dans la plupart des vignobles européens et mondiaux. Les symptômes externes se caractérisent par un retard de développement des organes aériens ; la végétation est affaiblie et les entre-nœuds des rameaux sont plus courts. Des chloroses et des nécroses sont présentes sur les feuilles. Cette maladie doit son nom au phytopathologiste qui l'a décrite en 1912 en observant notamment les symptômes internes caractérisés par des nécroses et des ponctuations noires dans la moelle des ceps atteints.

III-2. La maladie du pied noir

Cette maladie est associée aux champignons du genre *Cylindrocarpon* spp. L'espèce *Cylindrocarpon destructans* est celle qui a été découverte en premier en 1961 dans le vignoble français (Maluta et Larignon, 1991) avant d'être également isolée en Sicile (Grasso, 1984), au Portugal (Rego *et al.*, 2000; Rego *et al.*, 2005) et en Pennsylvanie (Gugino et Travis, 2003). D'autres espèces de *Cylindrocarpon* spp responsables de cette pathologie ont également été isolées au Chili, en Grèce, en Espagne, en Afrique du Sud (Fourie et Halleen, 2002) et en Australie (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007). Cette maladie affecte les jeunes ceps âgés de 2 à 10 ans. Les symptômes extérieurs sont caractérisés par un raccourcissement des entre-nœuds et une production de petites feuilles. A l'intérieur des ceps peut se développer une grosse et grande nécrose du xylème, de couleur brun foncé allant vers le noir. Le nombre de radicelles diminuant, cela peut amener à une perte de vigueur du cep et donc à la mort de celui-ci.

Les maladies de Petri et du Pied noir sont souvent difficiles à déterminer car les champignons impliqués agissent simultanément, un même cep pouvant donc être atteint par ces deux pathologies à la fois.

III-3. L'Eutypiose

L'Eutypiose est une des maladies de dépérissement les plus importantes causée par le champignon ascomycète *Eutypa lata* (Carter, 1991). Elle est présente dans quasiment tous les vignobles du monde et entraîne des pertes économiques conséquentes liées à la diminution de la production de raisin par les plantes.

E. lata a été isolé et identifié sur 88 espèces végétales réparties en 28 familles de plantes ligneuses pérennes dicotylédones présentes sur les 5 continents (Berraf et Peros, 2005; Cortesi et Milgroom, 2001; Wenneker et *al.*, 2006).

Le cycle biologique d'*E. lata* est présenté sur la figure I.1. Seule la forme sexuée est pathogène. Le champignon forme des périthèces sur les bois morts dans lesquels vont se former les ascospores (forme sexuée du champignon) qui seront disséminées par la pluie (Paillassa et *al.*, 1992) et par le vent sur de grandes distances (Ramos et *al.*, 1975).

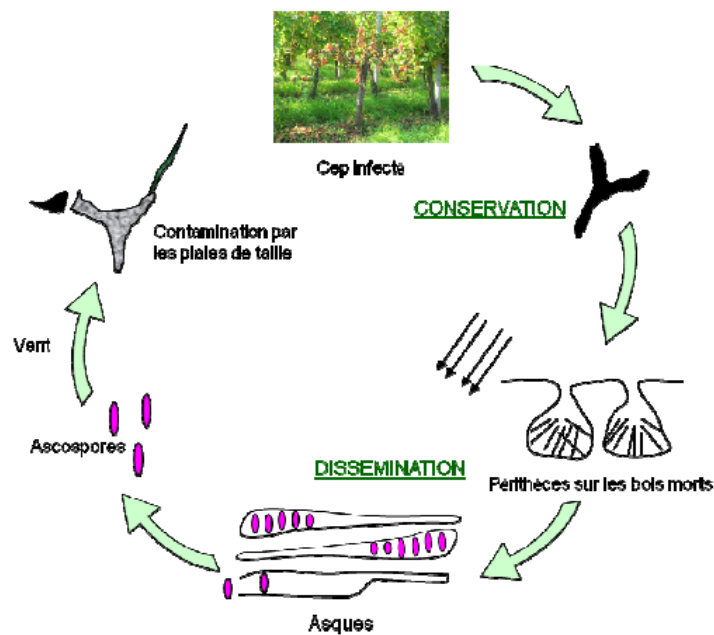


Figure I.1 : Cycle biologique d'*Eutypa lata* (Emilie Breuz, 2013)

Les plaies de taille et les blessures constituent une porte d'entrée pour le mycélium qui va coloniser les vaisseaux du xylème des bras et du tronc et provoquer l'apparition d'une nécrose brune sectorielle. Extérieurement, les symptômes se caractérisent par la formation d'internoeuds courts, l'apparition de chloroses et le repli des feuilles (Figure I.2). Lorsque le bras est coupé, une nécrose en forme de V est visible (Figure I.3). Des métabolites toxiques tels que l'eutypinol, l'eulatinol et le méthyleutypinol produits par le champignon sont responsables de l'apparition de ces symptômes.



Figure I.2: Raccourcissement de rameaux du à *Eutypa lata* (Urbez-Torres, 2006)



Figure I.3: Une nécrose en forme de V du à *Eutypa lata* (Urbez-Torres, 2006)

III-4. L'Esca

L'esca est la plus ancienne des maladies décrites sur la vigne. L'esca doit son nom à la présence de pourriture blanche. Il s'agit d'une maladie à étiologie très complexe dont les causes exactes restent encore à élucider. En effet, le Postulat de Koch n'est que partiellement vérifié : seule la formation des nécroses du bois est reproductible, non les symptômes foliaires. Appelée aussi Black Measles, l'Esca touche normalement les ceps de vigne âgés de 15 à 25 ans, mais des études ont récemment montré que les jeunes plantes pouvaient également être atteintes (Romanazzi *et al.*, 2009). En Europe, trois principaux champignons pathogènes, isolés des nécroses du bois, sont associés à l'esca : deux ascomycètes, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora* et un basidiomycète *Fomitiporia mediterranea*. De nombreux autres champignons dont certains pathogènes sont fréquemment isolés des nécroses du bois de plantes atteintes d'esca. C'est le cas d'*Eutypa lata*, agent responsable de l'Eutypiose, de différentes espèces de *Phaeoacremonium* sp. ou de nombreuses espèces de *Botryosphaeriaceae* (Larignon *et Dubos*, 1997).

Cette maladie se présente sous deux types de formes : la forme lente et la forme apoplectique (Figure I.4. a et b). Les symptômes foliaires sont caractéristiques de la forme lente même s'ils peuvent être présents chez la forme apoplectique (Larignon *et Dubos*, 1997). La forme lente se caractérise par des colorations foliaires spécifiques : tâches internervaires jaunâtres sur cépages blancs et bordées de rouges sur cépages noirs les nervures restant vertes. Ces tâches évoluent progressivement vers un brunissement et un dessèchement. Les symptômes foliaires de la forme lente peuvent être visibles une année sur un cep et disparaître l'année suivante (Maher *et al.*, 2012). La forme apoplectique est caractérisée par un dessèchement rapide des organes aériens, rameaux, feuilles et grappes d'une partie ou de la totalité du cep de vigne. Ce symptôme se manifeste généralement lorsque les étés sont chauds, entraînant la mort des ceps en quelques jours seulement sans symptômes annonciateurs.

Sur les baies, les symptômes observés diffèrent selon les pays. En France, les grappes se développent mais les baies flétrissent ou leur maturation est retardée. En Italie (Graniti, 1960; Grasso, 1969) et en Californie (Chiarappa, 1959), les symptômes sur baies sont décrits avec l'apparition de tâches violettes foncées ou gonflement des baies conduisant à leur éclatement.

Dans le bois, le développement de champignons associés à l'Esca conduit à la formation de deux types de nécroses : (i) une nécrose centrale de couleur claire, entourée d'une zone brune et dure, causée par *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella*

chlamydospora ; (ii) une nécrose sectorielle claire et tendre à partir de laquelle sont isolés *Eutypa lata* et *Fomitiporia mediterranea* (Larignon *et* Dubos, 1997). Ce dernier est responsable de la formation d'amadou ou pourriture blanche, caractérisée par du bois clair, dégradé et mou présent généralement au centre des nécroses.

Pour la forme apoplectique, Maher *et al.* (2012) ont montré que les ceps exprimant la forme apoplectique contenaient au niveau des bras et du tronc un volume de bois fonctionnel plus altéré par rapport aux ceps exprimant la forme lente ou asymptotiques.



Figure I.4 : Photos représentant la forme dite lente (4.a) et la forme apoplectique (4.b).

(Emilie Breuz, 2013)

III-5. Black Dead Arm (Le BDA.)

Le Black Dead Arm (BDA) est mentionné pour la première fois en 1974 par Lehoczky en Hongrie. Ce syndrome est seulement observé en France, depuis 1999, dans le

vignoble bordelais (Larignon *et al.* 2001). Peu d'informations sont disponibles à ce jour. Les agents pathogènes impliqués sont des ascomycètes de la famille des Botryosphaeriaceae comme *Diplodia seriata* anamorphe de *Botryosphaeria obtusa* (Schweinitz), *Diplodia mutila* et *Neofusicoccum parvum* (Larignon *et al.* 2001 ; Kuntzmann *et al.* 2010). Ils sont présents à la fois au niveau du bois de vignes symptomatiques et dans des plants de pépinières (Spagnolo *et al.* 2011). Par des tests de pathogénicité, leur capacité à provoquer des symptômes dans le bois a été démontrée. D'autres syndromes de dépérissement sur vigne causés par les *Botryosphaeriaceae* sont décrits dans la littérature (Úrbez-Torres *et al.* 2006). Il semble que ces différentes maladies pourraient être rapprochées (van Niekerk *et al.* 2006). De nouvelles connaissances sur la phylogénie de ces agents pathogènes ont été apportées récemment (van Niekerk *et al.* 2004 ; Pitt *et al.* 2010). Ces champignons sont aussi impliqués dans le syndrome de l'esca (Mugnai *et al.* 1999) et l'excoriose (Phillips 1998).

Les symptômes sont proches de ceux de l'esca et affectent la partie herbacée au printemps, vers la fin du mois de mai (Larignon *et al.* 2001). Au niveau du bois, la bande brune est observable sous l'écorce correspondrait à une nécrose interne. Lorsqu'une forme sévère de la maladie s'exprime, les tiges meurent, les feuilles tombent précocement, les fleurs et les fruits sèchent. Dans le cas de la forme légère, des décolorations internervaires rouges, sans liseré jaune, chez les cépages noirs (Figure I.5) et jaune orangé chez les cépages blancs apparaissent sur les feuilles. C'est cette dernière caractéristique qui permettrait de distinguer Esca et BlackDead Arm, bien que cela soit difficile sur cépage blanc. La similitude entre les deux types de symptômes laisse supposer qu'il s'agit de la même maladie (Lecomte *et al.* 2006).



Figure I.5 : Symptômes foliaires du black dead arm sur Merlot. (Lambert, 2011)

La conservation hivernale des agents du Black Dead Arm se fait sous forme de pycnides sur le cep et les bois de taille (Larignon *et al.* 2001). La dissémination des spores semble plus importante en période végétative (Brown-Rytlewski *et* McManus 2000 ; Kuntzmann *et al.* 2009): les plaies causées par les travaux en vert (épamprage, rognage) sont des voies d'entrée potentielles pour ces agents. Ils ont été détectés en pépinière à la surface et à l'intérieur des porte-greffes et des greffons.

Les Botryosphaeriaceae produisent des toxines polysaccharidiques (Martos *et al.* 2008) et des dérivés de la mélléine (Djoukeng *et al.* 2009) dont la phytotoxicité a été démontrée sur feuille mais n'a pas été reliée directement avec la pathogénicité des souches. L'analyse du protéome de *D. seriata* a mis en évidence des protéines potentiellement impliquées dans la pathogénèse (Cobos *et al.* 2010).

IV- Facteurs favorisant le dépérissement

L'expression des symptômes foliaires des maladies du bois exprime une grande variabilité d'une année à l'autre, que ce soit dans le cas de l'esca et du BDA. (Surico *et al.*, 2000) ou de l'eutypiose (Wicks et Creaser, 2001). L'hypothèse proposée implique plusieurs facteurs liés à l'environnement, au matériel végétal et aux pratiques culturales.

IV-1. Climat et sol

Le climat ainsi que les caractéristiques du sol sont les facteurs dont l'influence sur l'expression des symptômes a été étudiés. Il semble qu'un printemps chaud diminue l'incidence des symptômes de l'eutypiose (Sosnowski et *al.*, 2007). Dans le cas de l'esca, il est connu que la forme apoplectique est favorisée par un climat chaud et sec mais une corrélation directe entre la température, les précipitations et l'expression des symptômes n'a pas été établie (Surico et *al.*, 2000). Au vignoble, la dissémination des spores de la flore fongique responsable du BDA semble être accomplie toute l'année avec des maximums en conditions tempérées après une période pluvieuse (Bertsch, 2009; Urbez-Torres et *al.*, 2010).

Peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne l'effet de la nature du sol, toutefois les sols pauvres entraînent une mort plus rapide des pieds atteints par *E. lata*. Les sols chlorosants (fortement argileux) et donc mal drainés, accentuent la gravité des symptômes. Les sols carencés (sables littoraux) particulièrement sont favorables à l'expression de la maladie (Dubos, 1987). Concernant les types de sol, plusieurs éléments complémentaires ont déjà été signalés, Viala (1926), a rapporté que les sols argileux et compacts favorisaient l'apoplexie. Surico et *al.*, (2000), signalèrent que l'expression de l'esca est favorisée dans les sols lourds et humides. A l'opposé Lecomte et *al.* (2005), ont observé des symptômes importants d'esca dans une parcelle implantée sur sol à dominance sableuse, mais très humide au printemps.

IV-2. Cépages et portes greffes

Les études réalisées par Pèros et Berger (1994), sur la sensibilité des cépages ont révélé une influence notable du cépage sur l'incidence des maladies du bois. Vue la complexité des facteurs agissant sur la réceptivité des cépages, il est difficile d'établir un classement des cépages par rapport à leurs réaction vis à vis des pathogènes. La plupart des variétés de *Vitis vinifera* sont susceptibles à l'esca. Cette sensibilité est mal définie, mais semble à peu près identique à celle établie pour l'eutypiose (Dubos, 1999a). De même pour la sensibilité des cépages à l'égard des agents fongiques responsables des maladies du bois, les pieds mères présentent aussi des sensibilités différentielles. Certains porte-greffes (141B et 99 R) sont plus favorables à l'expression des symptômes de l'eutypiose (Pèros, 1999), alors que d'autres (SO4, 140 R), sont considérés comme des portes greffes vigoureux (Galet, 1995).

IV-3. Mode de conduite

Le mode de conduite joue un rôle important dans l'extension des maladies en relation avec le nombre, l'époque de taille et la dimension des plaies de taille (Galet, 1999). L'installation des champignons du bois qui sont des parasites de blessures est favorisée par les systèmes de taille qui provoquent de nombreuses et importantes plaies (Dubos, 1994).

IV-4. Réceptivité des ceps

Les agents fongiques responsables des maladies du bois cités précédemment; pénètrent essentiellement par les blessures des bras du tronc des souches au cours de la taille pratiquée, mais aussi par celles provoquées suite à la chute des feuilles, par les gelées, par le vent et par les nécroses bactériennes. Les nombreuses plaies offrent à ces agents lignicoles des sites de pénétration. La réceptivité de celle-ci diminue avec le vieillissement des plaies, elles deviendront moins sensibles avec le temps suite à la colonisation des antagonistes (Ramos *et al.*, 1975; Paillassa *et al.*, 1992).

V- Méthodes de lutte

La présentation de la biologie des différents agents pathogènes fongiques impliqués dans les maladies du bois met en évidence la diversité des modes d'infection, de dissémination. La variété des sources d'inoculum et le développement très lent et non visible des champignons dans le bois de vigne rendent très compliquée la mise en œuvre des méthodes de lutte. De plus, l'évolution de la réglementation des produits phytosanitaires à l'échelle européenne a conduit à l'interdiction de matière active utilisée pour la protection des plaies de taille par exemple. Les produits chimiques à base d'arsénite de sodium ont été interdits d'utilisation en 2001 en France à cause des effets cancérigènes sur l'homme et de la forte toxicité de ces produits sur l'environnement (Harmandon, 2004). De nombreuses recherches sont menées à travers le monde pour tester de nouvelles molécules utilisables en pépinière ou au vignoble. Des produits biologiques, à base de micro-organismes ou des produits naturels à base d'extraits de plantes, sont aussi à l'étude ou commercialisés. Les moyens de lutte culturels ou prophylactiques restent les plus fréquemment les seuls moyens de lutte à disposition du viticulteur. Une synthèse des différents moyens de lutte actuels est présentée.

V-1. Lutte chimique

Depuis le retrait de l'homologation de l'arsénite de soude du marché Européen en 2001, aucune solution de remplacement efficace et économiquement acceptable n'a été proposée à la profession viticole (Bertsch et *al.*, 2009). Des études récentes menées par la Mutualité Sociale Agricole (MSA) (France) ont montré que l'arsénite de soude était dangereux pour la santé des utilisateurs en dépit des précautions prises lors de son application (Herlemont, 2004). Il était capable de tuer la plupart des champignons associés aux maladies du bois dans le xylème comme le montrent les travaux de Larignon et *al.* (2008). Il n'avait toutefois aucune efficacité sur l'eutypiose (Larignon, 2009). En effet, sa réintroduction serait une aberration, tant au niveau écologique qu'au niveau pratique (Viret, 2004).

La difficulté de cette lutte réside dans le fait que les antifongiques traditionnels ne sont pas mobiles dans tout le système de la plante (phloème et xylème). Le plus pratique serait d'élaborer des fongicides systémiques phloémiens dotés d'une propriété particulière : l'ambimobilité. Les fongicides classiques, utilisés actuellement sont soit de contact, ils restent en surface des plantes traitées, soit systémiques ascendants, véhiculés avec la sève brute depuis les racines vers le feuillage. Ce qui explique que le seul remède proposé jusqu'ici consiste en un badigeonnage des plaies de taille, afin de constituer une barrière pour stopper l'envahissement par les spores de champignons parasites (Jousse, 2004).

V-2. Mesures préventives

La lutte contre les maladies du bois est essentiellement préventive à l'heure actuelle. Les mesures prophylactiques ont pour objectif de réduire la quantité d'inoculum dans les vignobles et de diminuer les risques de contamination à la pépinière. Malgré considérées comme nécessaires, il est impossible d'affirmer que ces mesures soient suffisantes comme moyen de lutte efficace contre les agents causaux des maladies du bois (Sentenac et *al.*, 2004).

La flore fongique associée aux maladies du bois se propagent surtout par le matériel végétal (Larignon et *al.*, 2006). Parmi les traitements effectués à la pépinière, les traitements à l'eau chaude se sont avérés efficaces pour diminuer les sources d'inoculum (Crous et *al.*, 2001; Rooney et Gubler, 2001), bien que l'efficacité de ce traitement dépende de la sensibilité des champignons (Casieri *et al.* 2009). Fourié et Halleen (2006), ont montré également que des bains de benomyl et de captane, réduisent la présence des champignons

dans les tissus ligneux au niveau de la soudure et à la base du plant. Ces mêmes auteurs ont indiqué que ces traitements sont également effectués sur les plants à la sortie de la pépinière.

Au vignoble, la lutte contre les maladies du bois consiste tout d'abord en des mesures prophylactiques afin de limiter l'extension de la maladie à partir de ceps infectés: limiter les apports nutritifs pour contrôler la vigueur, éliminer les bois morts qui sont sources d'inoculum, éviter les tailles sévères qui augmentent la surface des plaies et le risque de contamination et pratiquer une taille tardive afin de réduire la contamination. Les solutions actuelles sont limitées et consistent à pratiquer un recépage au-dessous de la zone infectée en conservant un gourmand à la base du cep, protéger la plaie de taille et pratiquer un surgreffage est également efficace en éliminant la partie malade (Larignon, 2009 b).

V-3. Lutte biologique

Un biopesticide d'origine microbienne est un organisme comme une bactérie, un virus, un champignon ou un protozoaire, utilisé pour contrôler une maladie ou un ravageur. La littérature rapporte de nombreux travaux réalisés à travers le monde en plein champ et sous serre pour le contrôle d'un certain nombre de maladies causées par des pathogènes telluriques, foliaires ou de post-récoltes (Saravanakumar et al., 2007). Chez la plupart de ces organismes biopesticides, l'activité antagoniste a souvent été associée à la production de métabolites secondaires (Silva et al., 2001).

Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies des plantes, les *Pseudomonas* spp. *Bacillus* spp. Et *Trichoderma* spp qui a fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la protection de la vigne vis-à-vis des maladies du bois. Ce micro-organisme ascomycète isolé du sol a des propriétés d'antagonisme et d'hyper parasitisme vis-à-vis de nombreux agents pathogènes de plante (Amreen et Kumar, 2012; Lee et al., 2012; Tuao-Gava et Leal-Menezes, 2012). De plus, appliqué au sol ou sur la plante il est capable de stimuler la croissance des jeunes plants et de protéger les plantes vis-à-vis de stress abiotiques (Fourie et Halleen, 2005). Des produits commerciaux à base de *Trichoderma* sont utilisés en pépinière lors de l'élevage des plants greffés. Sur jeunes plants, Fourie et al. (2001) ont montré également un effet d'inhibition de *Trichoderma* sur les champignons pathogènes de la vigne : Pch, *Phaeoacremonium* spp. et *Cylindrocarpon* spp. En protection des plaies de taille, John et al. (2005) montrent l'efficacité de *Trichoderma* vis-à-vis d'*Eutypa lata*. Di Marco et al. (2004) montrent que *Trichoderma harzianum* empêche le développement de Pch. *Trichoderma atroviride* et *T. harzianum* réduisent les

infections artificielles de Pch et d'espèces de *Botryosphaeriaceae* (Kotze *et al.*, 2011). Des plants biotisés avec *Trichoderma atroviride* et des produits phytosanitaires ou des fertilisants enrichis avec *Trichoderma* sont aujourd'hui commercialisés. D'autres micro-organismes aux propriétés antagonistes ont également été testés : *Cladosporium herbarum*, *Fusarium lateritium*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* et *Erwinia herbicola* (Ferreira *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 2001). Des molécules naturelles telles que le chitosane ou la cystéine (Nascimento *et al.*, 2007; Octave *et al.*, 2005) ont montré *in vitro* ou en serre des potentialités de protection intéressantes contre certains champignons associés aux maladies du bois. Il reste cependant à les tester en conditions réelles afin de valider leur efficacité et de pouvoir formuler des produits destinés à une mise sur le marché.

Les mesures sanitaires de prophylaxie restent largement utilisées au vignoble pour limiter le développement des maladies du bois. Le retrait des bois morts ainsi que le changement du mode de taille ont prouvé leur efficacité vis-à-vis de l'eutypiose, en regression dans de nombreuses régions viticoles (Weber *et al.*, 2007). Le rôle des sarments laissés au sol comme source d'inoculum est avancé sans qu'il y ait des preuves de leur importance. Toutefois, il est démontré que le compostage des sarments de vigne permet d'éradiquer les champignons impliqués dans les maladies du bois grâce à l'effet délétère d'une élévation de température (Lecomte *et al.*, 2006). Afin d'éviter l'arrachage des souches dépérissantes, il est possible de pratiquer le recépage ou le greffage à partir du tronc sectionné (Creaser et Wicks, 2004). Au vignoble, les viticulteurs réalisent de plus en plus une double taille (Deux passage successifs pour tailler la vigne). En effet, si des micro-organismes entrent par les plaies laissées par la première taille en hiver et commencent à se développer, la deuxième taille effectuée quelques mois après, avant le commencement du cycle végétatif, permet d'éliminer la partie infectée. En complément de cette méthode, des produits phytosanitaires sont appliqués sur les plaies afin de limiter l'invasion des agents pathogènes.

A la pépinière, afin de diminuer le taux d'infection des bois ou des plants de vigne, ceux-ci peuvent être traités à l'eau chaude. Ce traitement est utilisé dans certaines régions viticoles pour éliminer le phytoplasme de la flavescence dorée. Plusieurs protocoles existent. Par exemple, Les bois ou les plantes peuvent subir deux traitements à l'eau chaude (Gramaje *et al.*, 2009; Waite et Morton, 2007) : le premier d'une durée de 5 min à 54°C et le deuxième de 30 à 45 min à 50°C. Ce traitement possède cependant deux limitations : il stresse la plante pouvant mener des problèmes de reprise de la végétation pour certains plants et il ne cible

pas spécifiquement les champignons pathogènes sachant que d'autres micro-organismes pour certains utiles sont également présents dans les tissus.

Toutes les méthodes présentées ont généralement une efficacité partielle parfois de courte durée alors que ces maladies se caractérisent par un développement sur une longue période qu'il est difficile de mesurer. Les coûts d'application sont en général élevés pour les viticulteurs surtout lorsque l'efficacité n'est pas réellement démontrée au vignoble. Les viticulteurs sont souvent démunis devant la mortalité parfois très fréquente dans leur vigne. Même si les recherches appliquées se sont accélérées depuis plus de dix années, les résultats fiables ne sont pas à la hauteur des attentes de la profession. Suite à l'arrêt de l'utilisation de l'arsénite, en 2001, les pouvoirs publics ont mis en place un observatoire des maladies du bois afin d'évaluer la fréquence des principales maladies du bois: l'esca et BDA et l'eutypiose à partir de 2003 dans les différents bassins de production viticole français et pour les principaux cépages. Les résultats de cette enquête menée en 2003 et 2008, permettant ainsi d'aborder le comportement des différents cépages dans différents contextes pédo-climatiques.

VI- Généralités sur le genre *Trichoderma*

VI-1. Historique et taxonomie

Le terme «*Trichoderma*» a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Rifai, 1969; Bisset et al., 1991; Monte et al., 2003; Chaverri et Samuel., 2003; Degenkolb et al., 2008). Les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique (Widden et Scottolin, 1988; Vining et al., 1990; Fujita et al., 1994; Samuel, 2006).

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma* sp., on se rend vite compte que leur position taxonomique n'a pas été facile. En 1794, Persoon décrit le premier *Trichoderma* sp et établit 4 espèces.

En 1821, Fries classe les *Trichoderma* sp parmi les Gastéromycètes.

En 1860, Tulasne a reconnu l'absence de formes téléomorphes (sexuées) chez ce genre.

En 1871, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques (phialides).

En 1916, Waksman décrit ce qu'il trouve être 6 nouvelles souches de *Trichoderma* sp. En utilisant des critères macroscopiques.

En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* avec d'autres critères.

En 1939, Bisby propose une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma* sp.

En 1963, Gutter et Monbasher ont démontré la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales. En 1969, Rifai propose une classification utilisable avec le concept «d'espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques.

Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer. Neuf espèces agrégées sont décrites (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai., 1969).

En 1991, Bissett regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtman, 1996) se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides (Lieckfeldt et al., 1998; Landreau., 2001; Dodd et al., 2002).

D'après Bissett et al., (2004); la position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp est la suivante :

Embranchement:	<i>Amastigomycota et/ou Eumycètes</i>
Sous embranchement:	<i>Ascomycotina</i>
Classe:	<i>Sordariomycètes</i>
Ordre:	<i>Hypocréales</i>
Famille:	<i>Hypocraceae</i>
Genre:	<i>Trichoderma</i>

VI-2. Morphologie

Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. La conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse (Mohamed-Benkada, 2006).

VI-3. Ecologie

Les *Trichoderma* sp. sont des saprophytes omniprésents dans le sol. Ils sporulent abondamment, ont peu de besoins nutritionnels, peuvent croître rapidement et produire des gammes diversifiées de métabolites secondaires. En outre, ils ont la capacité de transformer une variété extrêmement large de matériaux organiques naturels. Ils sont bien connus comme hyper-producteurs d'enzymes de dégradation comme les chitinases et les cellulases. Ils ont été promus indirectement comme agents de lutte biologique et stimulateurs de croissance des plantes (Papavizas, 1985; Elad, 2000; Freeman et al., 2004; Dubey et al., 2007; Jayalakshmi et al., 2009). Les espèces de *Trichoderma* utilisent généralement les sources d'azote à partir de composés d'ammonium et de protéines, l'assimilation du nitrate est rare et dépend de l'espèce (Mahesh et al., 2005). Les substrats carbonés très diversifiés comprennent une large gamme de sucres ; certaines espèces peuvent utiliser l'inuline, raffinose, saccharose, acides tannique et gallique (Stevenson et Weimer, 2002; Gond et al., 2007; Olejnikova et al., 2011).

VI-4. Interaction *Trichoderma* sp.-agent pathogène

VI-4-1. *Trichoderma* sp., agent de lutte biologique

Une colonisation importante d'un habitat donné par tout organisme dépend essentiellement de sa capacité à défendre ses niches écologiques même s'il y a concurrence pour les nutriments, l'espace et la lumière. De nombreux champignons et particulièrement ceux du genre *Trichoderma* sont spécialisés dans ce domaine (Harman, 2006; Ruocco et al., 2009; Vinale et al., 2009).

La recherche sur les propriétés antagonistes de *Trichoderma* sp. a progressé depuis la découverte en 1932 de *Trichoderma lignorum* (révélé plus tard *T. atroviride*) agissant comme un parasite sur d'autres champignons (Schuster et Schmoll, 2010; Harman, 2011). De nombreuses espèces de *Trichoderma*, principalement *T. harzianum*, *T. virens*, et *T. asperellum* sont utilisées dans la lutte biologique contre les champignons pathogènes des plantes tels que *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora* et *Diaporthe*.

VI-4-2. Mode d'action.

VI-4-2-1. Mycoparasitisme et enzymes lytiques.

L'abondance de *Trichoderma* sp. dans les écosystèmes est due à leur production élevée d'enzymes hydrolytiques et leur mycoparasitisme basé sur la sécrétion d'un ensemble complexe d'enzymes dégradant la paroi cellulaire de divers hôtes (Calistru et *al.*, 1997; Eziashi et *al.*, 2006; Reino et *al.*, 2008). Un système multi-enzymatique important a été décrit chez des espèces de *Trichoderma*: les cellulases (Castro et *al.*, 2010) les chitinases (De la Cruz et *al.*, 1992), β -1,3 – glucanases (De La Cruz et *al.*, 1995; Lorito et *al.*, 1994; Noronha et Ulhoa, 1996), β -1,6- glucanases (De La Cruz et *al.*, 1995), β -1,3 -glucanases (Ait-Lahsen et *al.*, 2001) et des protéases (Geremia et *al.*, 1993; Howell, 2003).

Le mécanisme du mycoparasitisme comprend différentes étapes:

- **La Stimulation:**

Trichoderma sp. perçoit la présence de son hôte, ses hyphes se dirigent directement vers lui par chimiotropisme. Différentes espèces peuvent suivre différents modèles d'induction, mais en général les champignons produisent des exochitinases à de faibles niveaux dont la diffusion de ces dernières catalyse la libération des oligomères de la paroi fongique du champignon cible, et à leur tour en induisent l'expression de endochitinases qui attaqueront le champignon cible avant le contact (Viterbo et *al.*, 2002; Brunner et *al.*, 2003).

- **La Reconnaissance et l'Enroulement:**

L'attachement se fait par la liaison des glucides de la paroi fongique du *Trichoderma* à des lectines sur le champignon cible. Une fois que le *Trichoderma* est attaché, il s'enroule autour de l'agent pathogène et forme des appressoriums contenant des concentrations élevées de solutés osmotiques tels que le glycérol (Benitez et *al.*, 2004).

- **La Pénétration et la lyse :**

La production des enzymes lytiques et des peptaïboles permet l'entrée des hyphes de *Trichoderma* dans les hyphes du parasite et facilite ainsi l'assimilation du contenu cellulaire de l'hôte (Howell, 2003).

VI-4-2-2. Compétition pour les nutriments et l'espace

La compétition pour le carbone, l'azote et d'autres facteurs de croissance, ainsi que la celle pour l'espace ou les sites spécifiques d'infection, sont utilisées par les agents de lutte

biologique, *Trichoderma* sp. a une forte capacité à utiliser et métaboliser les nutriments du sol, qui le rend plus compétitif à de nombreux micro-organismes du sol (Benitez et al.,2004). *T. harzianum* est capable de contrôler *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise chez le raisin en colonisant les tissus floraux et éliminant le pathogène de son site d'infection (Vinale et al., 2009). Sivan et Chet (1989) ont démontré que la compétition pour les nutriments est le principal mécanisme utilisé par *T. harzianum* pour contrôler *Fusarium.oxysporum f.sp. melonis*.

Chapitre II : Matériels et méthodes

I- Introduction

Les essais de lutte biologiques sont expérimentés à titre d'alternative ou de complément aux méthodes chimiques conventionnelles. Dans nos essais nous avons sélectionnés un champignon dit *Trichoderma* sp. cette espèce est connue par ces principes actifs et ces effets pharmaceutiques.

II- Prélèvement des échantillons de bois

Nos échantillons ont été obtenus à partir du tronc et des restes des arbres d'agrumes arrachés et délaissés. Les prélèvements ont été effectués dans des conditions stériles, les outils utilisés (sécateurs, scies et autres) ont été désinfectés par l'eau javellisée. Ils ont été conservés dans des sacs en papier portant toutes les informations utiles (verger, date de prélèvement et le type de symptômes) pour une éventuelle analyse au laboratoire. De chaque arbre 2 à 3 fragments de bois ont été découpés, cinq bûchettes ont été prélevées de ces derniers (1×1 cm) (partie saine et infectée) afin de réaliser des isolements de la flore fongique associée aux dépérissements.

III- Diagnostic au laboratoire

III- 1. Isolement et recherche des agents causals

La méthode de diagnostic classiquement utilisée consiste à isoler les microorganismes des fragments de bois sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonhston and Booth, 1983) (Annexe. A).

Cette manipulation consiste à une désinfection superficielle des fragments pour éliminer le maximum de la microflore secondaire ou accessoire de la surface. Les fragments ont subi un passage dans une solution d'hypochlorite (6%) pendant 5 minutes. Ces échantillons ont été rincé à l'eau distillée stérile, séchés entre deux feuilles de papier filtre stérile et déposés dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA.

III-2. Observation et purification des cultures

Après 5 à 6 jours d'incubation à 25°C et à l'obscurité, seulement les colonies présentant des caractéristiques macromorphologiques ressemblant à ceux des agents recherchés ont été sélectionnées. Ces dernières ont été et transplantées dans de nouvelles boîtes de Pétri sur le milieu PDA.

III-3. Etude microbiologique

III-3.1. Caractérisation culturelle

Les cultures purifiées ont été laissées en incubation de 10 à 15 jours, pour obtenir une croissance optimale. Dès que le développement est apparent, des observations quotidiennes sont effectuées pour détecter d'éventuels caractères cultureux spécifiques aux agents fongiques recherchés. Parmi les caractères recherchés, nous nous sommes basée sur : la couleur, l'aspect, la forme des colonies, leurs vitesse de croissance et d'éventuels pigmentations.

III-3.2. Caractères micro-morphologiques

Des observations microscopiques sous un grossissement (10×10 et 10×40) ont été effectuées sur des montages entre lame et lamelle obtenue à partir des cultures pures. Les principaux caractères mycéliens : aspect, forme, couleur, nature des hyphes.

IV- Étude *in vitro* du pouvoir antifongique de *Trichoderma*

IV-1. Souches fongiques

Deux isolats fongiques ont été utilisés dans cette expérimentation appartenant au genre *Botryosphaeria*. fourni par Mme Ammad de sa collection des organismes phytopathogène du Laboratoire de mycologie, département de Biotechnologie université Blida 1.

IV-2. Maintien de la souche fongique

Les souches fongiques utilisées dans cette étude ont été entretenue par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato dextrose agar) (Annexe) à pH=6,5-7 (Johnston, et Booth C.

1983), favorable à leur croissance. Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave (20 min à 115° C) et refroidis au bain Marie à 45°C puis coulés sous forme d'une couche plus ou moins épaisse en boîte de pétri de 9 cm de diamètre. La culture et croissance se fait à l'incubateur à une température de 27°C à l'obscurité. La période de croissance varie de 3 à 5 jours au maximum pour le champignon.

V- Activité antifongique

L'activité antifongique vis-à-vis les deux espèces du *Botryosphaeria* a été déterminée par deux techniques :

- 1- **La technique de confrontation directe** : Les confrontations *in vitro* sont effectuées selon la méthode de Patel et Brown, (1969) et Hajieghrari et al.(2008). Cette méthode consiste à déposer deux explants de 5 mm de diamètre provenant des cultures des deux champignons (*Botryosphaeria* et *Trichoderma*) dans des boîtes de Pétri contenant du PDA. Les explants sont placés suivant un axe diamétral à 3 cm de distance et à équidistance du centre de la boîte.
- 2- **La technique d'ensemencement en masse** : ce dernier consiste à utiliser 6 ml de l'eau distillé stérile contenant de *Trichoderma* sp. Nous avons utilisé trois concentrations (1ml, 2ml et 3ml) de la solution obtenue. Après le dépôt de cette solution nous avons ajouté le milieu PDA ci-dessous. Après solidification, 1 explant de 6 mm de diamètre de *Botryosphaeria* sp. a été déposé.

Toutes les combinaisons entre les 2 champignons de l'antagoniste sont réalisées et répétées 3 fois. Les témoins sont représenté par des boites de pétri contenant uniquement le champignon pathogène.

Toutes les boites de pétri ont été scellés avec du parafilm le long du bord pour éviter la diffusion des composés volatils du biopesticide microbien ainsi que les contaminations. L'estimation de la croissance mycélienne a été réalisée à deux pas de temps à savoir 5 et 10 jours après traitement. Pour une meilleure mesure des diamètres de croissance, toutes les boites ont été prises en photos numérisées puis traitées par le logiciel IMAGE TOOL (3.0). Trois mesures ont été retenues pour chaque diamètre radial. La croissance radiale est exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en utilisant la formule décrite par Pandey et *a.l*, (2000).

$$PI = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

- **PI** : Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés (%)
- **D_c** : le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon non traité (mm)
- **D_t** : Le diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon traité (mm)

VI- Analyse statistique

Après calcul des moyennes des trois répétitions pour chaque interaction (concentration et agent fongique), des analyses statistiques ont été effectués, afin de tester les interactions entre les facteurs (dose, temps et matière active). La variance est déterminée par le G.L.M (General Linear Model). Les différences ont été considérées significatives à $P < 0.05$.

Chapitre III : Résultats et discussions

I-ETUDE ETIOLOGIQUE

1. Caractérisation et identification des agents fongiques

La plupart de la flore fongique isolée est associée avec la symptomatologie des dépérissements enregistrés sur les plants d'agrumes étudié appartient au genre fongiques *Trichoderma*.

a. Caractérisation morphologique et micro-morphologique de *Trichoderma*

Sur le milieu PDA les isolats de *Trichoderma* ont montré une croissance régulière. Les colonies présentent de couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. Les colonies fongiques sont légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes (Figure III.5).

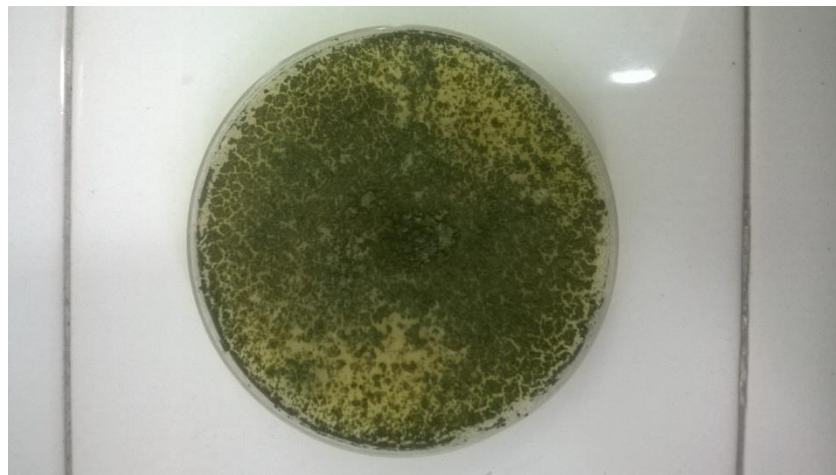


Figure III.6 : Isolats de *Trichoderma* sur le milieu PDA

Les observations microscopiques ont montré que ce champignon présente un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. La caractérisation micro-morphologique reste un élément incomplet pour établir une description à des fins déterminatives et de classification.

2. Evaluation de l'activité antifongique

L'étude du pouvoir antifongique du traitement microbien à base de *Trichoderma* sp. a été évaluée *in vitro* sur deux espèces fongiques du genre *Botryosphaeria* en utilisant deux méthodes de traitement : confrontation directe et ensemencement en masse. D'après nos résultats (Tableau III.2), le champignon testé a montré des activités antifongiques sur les

isolats testés, se traduisant par l'inhibition de leur croissance qui varie d'un isolat fongique à l'autre (Tableau III.3).

Les résultats présentés sur les tableaux (III.2 et III.3) ont montré que *Trichoderma* avec les deux modes de traitement présentent un pouvoir antifongique contre les isolats fongiques testés.

Tableau III.2 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de *Trichoderma* sp. vis à vis des isolats fongiques par la technique de confrontation directe

Temps \ Isolats	24h				48h				
	Répétition								
	1	2	3	Témoin	1	2	3	Témoin	
Bo sp 1	MC (cm)	3.3	3.15	3.2	4	5.75	6.05	5.9	8
	PI %	17.50	21.25	20	00	32.35	28.82	30.58	00
Bo sp 2	MC (cm)	2.35	2.6	2	2.8	5	5.3	4.9	6.6
	PI %	16.05	7.14	28.50	00	24.24	19.69	25.75	00

Botryosphaeria sp. (Bo)

MC : Moyen de croissance, PI : Pourcentage d'inhibition

Tableau III.3 : Résultats des tests du pouvoir antifongique de *Trichoderma* sp. vis à vis des isolats fongiques par la technique d'ensemencement en masse

Temps \ Isolats	<i>Botryosphaeria</i> sp. 1				<i>Botryosphaeria</i> sp. 2				
	Doses								
	1 ml	2ml	3ml	Témoin	1ml	2ml	3ml	Témoin	
5 jours	MC (cm)	2.4	1.75	0.75	8.5	1.45	1.05	0.85	8.5
	PI %	71.7	79.4	91.1	00	82.9	87.6	90	00

Botryosphaeria sp. (Bo)

MC : Moyen de croissance, PI : Pourcentage d'inhibition

Le *Trichoderma* testé dans cette étude présente des effets antifongiques très élevés dont les pourcentages d’inhibition dépassent les 90% pour les deux isolats de *Botryosphaeria* traités par la technique ensemencement en masse (Tableau III.3). En revanche ce champignon a montré un taux d’inhibition qui ne dépasse pas 29% pour la deuxième technique (confrontation directe) (Tableau III.2).

D’après la figure (III.7), il apparaît que le *Trichoderma* utilisées s’est révélée qualitativement et quantitativement actifs sur les isolats testés se traduisant par la formation de zones d’inhibition claires et des halos d’inhibition, comparées au témoin.


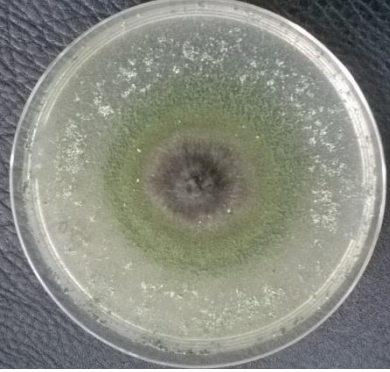


Modes Isolats	Confrontation directe	Ensemencement en masse
	Temps (5 jours)	
<i>Botryosphaeria</i> sp. 1		
<i>Botryosphaeria</i> sp. 2		

Figure III.7 : Pouvoir antifongique de *Trichoderma* sp. vis à vis des isolats fongiques par l’inhibition de la croissance mycélienne

3. Analyse comparative de l'activité antifongique de *Trichoderma* sp.

3.1. Etude comparative de confrontation directe de *Trichoderma* sp. avec les deux isolats fongiques

L'utilisation du modèle général linéaire (G.L.M.) a permis d'étudier la variation temporelle du taux d'inhibition de la croissance mycélienne des différents isolats phytopathogènes, en fonction des deux méthodes de traitement appliquées, doses, temps et isolats. Le tableau (Tableau III.4) dénote que le mode de traitement par rapport au temps révèlent la présence d'une différence très hautement significative sur les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* sp. 1 (F-ratio= 49,000 ; p=0,002 ; p< 0,1%). Même les taux de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* sp. 2 révèlent la présence d'une différence très hautement significative respectivement (F-ratio= 49,000 et p=0,001 ; p<0,1).

Tableau III.4 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet de temps sur la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* avec la technique de confrontation directe

Source	Somme des carrés	DDL	Moyenne des écarts	F-ratio	P
Temps (Boy 1)	8,167	1	8,167	49,000	0,002**
Temps (Boy 2)	10,667	1	10,667	64,000	0,001**
Var. résiduelle	0.667	4	0.167		

N.S. : non significative, * : moyennement significative à 5 % ; ** : hautement significative à 1 % ; *** : très hautement significative à 0,1 %

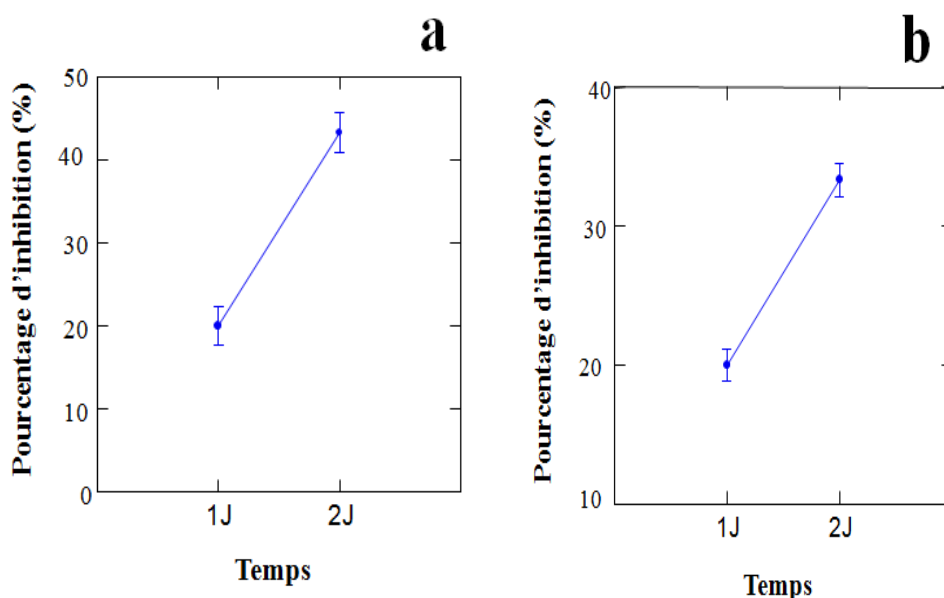


Figure III.8 : Étude temporelle comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats phytopathogènes selon la technique de confrontation sous l'effet de *Trichoderma* sp.

(a : *Botryosphaeria* sp. 1, b : *Botryosphaeria* sp. 2)

Les résultats obtenus (Figure III.8. a et b), de l'effet antifongique de *Trichoderma* sp. sur les phytopathogènes a induit un pourcentage d'inhibition élevé de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* sp. 1 (PI= 20%) (Figure III.8.a) et *Botryosphaeria* sp. 2 (PI= 20%) (Figure III.8.b) pour le premier jour. Après deux jours, l'effet augmente avec une croissance mycélienne de *Botryosphaeria* sp. 1 (PI= 42%) et *Botryosphaeria* sp. 2 (PI= 32%).

Tableau III.5 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet de temps sur la croissance mycélienne de *Botryosphaeria*

Source	Somme des carrés	DDL	Moyenne des écarts	F-ratio	P
Temps	18,750	1	18,750	119,118	0,000
Isolats	2,083	1	2,083	13,235	0,005
Var. résiduelle	1,417	9	0.157		

N.S. : non significative, * : moyennement significative à 5 % ; ** : hautement significative à 1 % ; *** : très hautement significative à 0,1 %

L'application du modèle G.L.M. sur les résultats de *Trichoderma* vis-à-vis les deux isolats fongique testés par la technique de confrontation directe, nous permet de déduire que le facteur dose présente une activité antifongique hautement significative ($p= 0,000$) vis-à-vis des isolats (Tableau III.5).

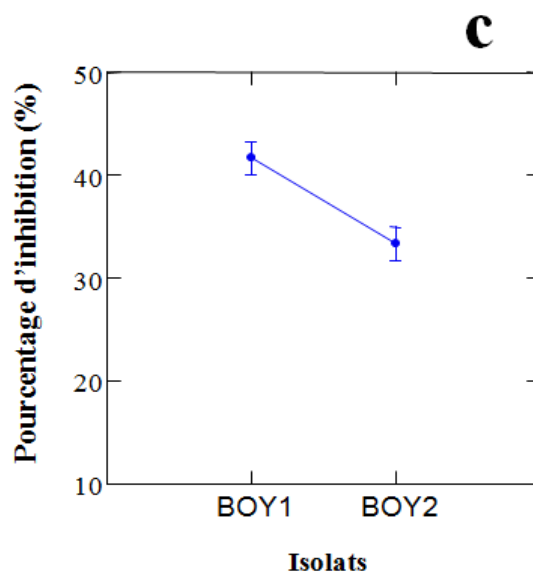


Figure III.9 : Étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats phytopathogènes selon la technique de confrontation
(BOY 1: *Botryosphaeria* sp 1, BOY 2 : *Botryosphaeria* sp 2)

D'après ces résultats obtenus (Figure III.9.c), le *Trichoderma* sp inhibe plus efficacement la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* sp 1 en comparaison avec *Botryosphaeria* sp 2.

3.2. Etude comparative d'ensemencement en masse de *Trichoderma* sp avec les deux isolats fongiques

L'application du modèle G.L.M. sur les résultats de *Trichoderma* vis-à-vis les deux isolats fongique testés, nous permet de déduire que le facteur dose présente une activité antifongique très hautement significative sur les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* sp. 1 (F-ratio= 672,824; $p=0,000$; $p< 0,1\%$) et *Botryosphaeria* sp. 2 (F-ratio= 7,158 et $p=0,020$; $p<0,1$). (Tableau III.6).

Tableau III.6 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet des doses sur la croissance mycélienne de *Botryosphaeria* avec la technique d'ensemencement en masse

Source	Somme des carrés	DD L	Moyenne des écarts	F-ratio	P
Doses (Boy 1)	4,575	2	2,288	672,82 4	0,000
Var. résiduelle	0,020	6	0,003		
Doses (Boy 2)	1,35	2	0,678	7,158	0,020 ***
Var. résiduelle	0,663	7	0,095		

N.S. : non significative, * : moyennement significative à 5 % ; ** : hautement significative à 1 % ; *** : très hautement significative à 0,1 %

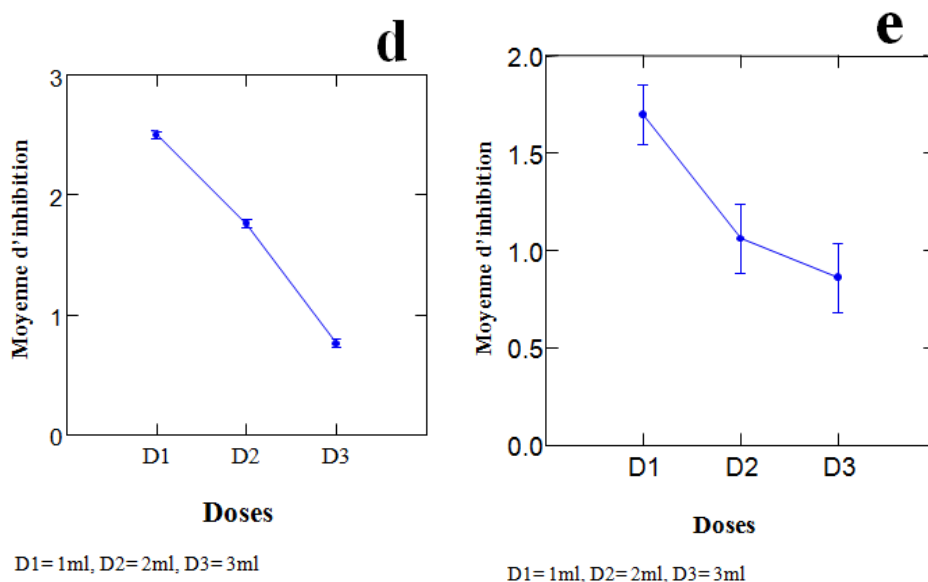


Figure III.10 : Étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats phytopathogènes selon la technique d'ensemencement en masse sous l'effet de *Trichoderma*

(d : *Botryosphaeria* sp 1, e : *Botryosphaeria* sp 2)

Les résultats obtenus (Figure III.10. d et e) indiquent que les doses les moins diluées inhibent plus efficacement que lorsqu'elles sont diluées. Cette efficacité se traduit par une moyenne d'inhibition faible.

Tableau III.7 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet des doses sur la croissance mycélienne de *Botryosphaeria*

Source	Somme des carrés	DD L	Moyenne des écarts	F-ratio	P
Isolats	1,817	1	1,817	5,485	0,032** *
Var. résiduelle	5,631	17	0,331		

N.S. : non significative, * : moyennement significative à 5 % ; ** : hautement significative à 1 % ; *** : très hautement significative à 0,1 %

L'application du modèle G.L.M. sur les résultats de *Trichoderma* vis-à-vis les deux isolats fongique testés, nous permet de déduire que le facteur dose présente une activité antifongique très hautement significative (F-ratio= 5,485 ; p=0,032 ; p< 0,1%) vis-à-vis des isolats (Tableau III.7).

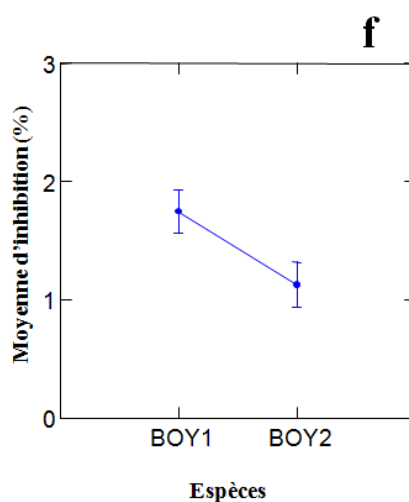


Figure III.11 : Étude comparative des taux d'inhibition de la croissance mycélienne des souches phytopathogènes selon la technique d'ensemencement en masse (BOY 1: *Botryosphaeria* sp. 1, BOY 2: *Botryosphaeria* sp. 2)

D'après les résultats obtenus (Figure III.11.f), le *Trichoderma* sp inhibe toujours la croissance mycélienne plus efficacement de *Botryosphaeria* sp. 1 que *Botryosphaeria* sp. 2. Nous pouvons dire que quel que soit le mode de traitement, l'isolat *Botryosphaeria* sp1 présente une sensibilité assez importante au *Trichoderma* en comparaison avec le deuxième isolat.

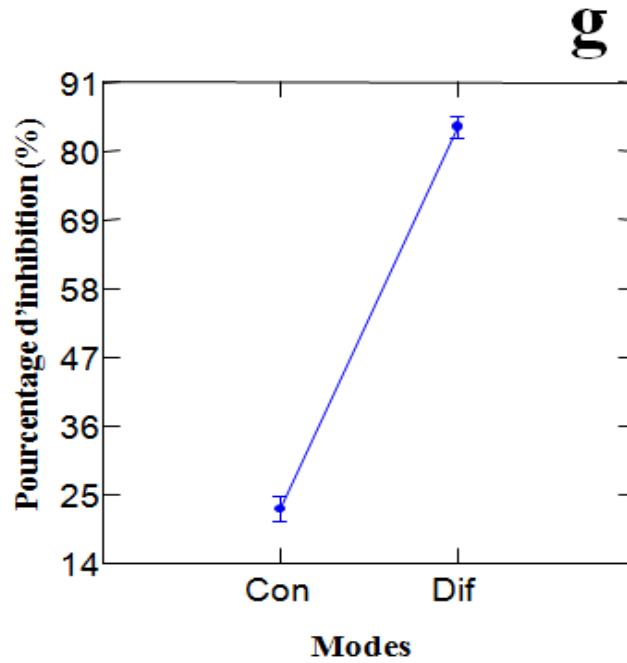
3.3. Etude comparative entre les deux techniques de traitement (confrontation directe et ensemencement en masse) :

L'application du modèle G.L.M pour les 504 données (tableau III.8, figure III.12. g), a permis de déduire que les effets antifongiques de *Trichoderma* sont hautement significatifs selon la technique de traitement (P=0.000). nous avons enregistré un taux d'inhibition qui dépasse 90% avec le mode de traitement encensement en masse.

Tableau III.8 : Modèle G.L.M. appliqué à l'effet des deux traitements sur la croissance mycélienne de *Botryosphaeria*

Source	Somme des carrés	DDL	Moyenne des écarts	F-ratio	P
Traitements	26880,578	1	126880,578	540,654	0,000
Var. résiduelle	1392,122	28	49,719		

N.S. : non significative, * : moyennement significative à 5 % ; ** : hautement significative à 1 % ; *** : très hautement significative à 0,1 %



Con: confrontation directe, Dif: diffusion

Figure III.12 : Etude comparative entre confrontation directe et ensemencement en masse

Les résultats obtenus (Figure III.12. g) le pourcentage d'inhibition de la technique d'ensemencement en masse est plus élevée que la technique de confrontation directe. Cet élevage ne traduit que la technique d'ensemencement en masse et plus efficace que la technique de confrontation directe.

II- Discussion

L'objectif de cette approche de lutte, est de tenter de détecter un éventuel pouvoir antifongique *in vitro* d'un agent fongique « *Trichoderma* » à l'égard de deux isolats phytopathogènes de la vigne appartenant au genre *Botryosphaeria*. L'intérêt de cette étude réside dans le fait que ces bioagresseurs s'attaquent à la vigne et à d'autres plants arboricoles et forestiers, et aucun traitement efficace n'existe apparemment surtout après l'interdiction de l'arsénite de sodium.

On rappelle que le genre *Trichoderma* est un groupe agronomiquement important car il comprend des champignons « agents de bio contrôle » dont le mode d'action a fait l'objet de nombreux travaux. Des études récentes font en effet l'état d'une capacité de ce champignon filamenteux à intervenir selon divers mécanismes : mycoparasitisme, antagonisme (compétition), antibiose (production d'antibiotiques), stimulation racinaire, stimulation de la croissance par solubilisation de minéraux fertilisants, stimulation des défenses naturelles des plantes, etc.

Les opérations d'isolement à partir des fragments de bois nécrosé des arbres des agrumes déperis, naturellement infesté du genre *Botryosphaeria.*, après purification et caractérisation mycologique, ont mis en évidence l'existence d'un agent fongique dit *Trichoderma* sp. Cet agent fongique a montré un effet biologique efficace qui provoque fréquemment une certaine phytotoxicité. C'est un agent de contrôle pour protéger un certain nombre de plantes cultivées contre les dommages induites par les bios agresseurs.

Les résultats de la lutte menés dans cette étude semblent être intéressants, l'agent fongique dit *Trichoderma* a montré son pouvoir antifongique vis-à-vis des champignons étudiés. Les applications réalisées ont enregistré une efficacité le long du suivi. Les résultats obtenus montrent une nette réduction du diamètre moyen des colonies de *Botryosphaeria* sp. en présence de *Trichoderma* sp par rapport au témoin non traité. Après cinq jours d'incubation à 25 °C, cette réduction atteint 48 mm pour l'isolat *Botryosphaeria* sp1 traduisant une inhibition de l'ordre de 80% et 90% pour l'isolat *Botryosphaeria* sp 2.

Dans ce même sens, Daami-Remadi (2001) a montré l'effet fortement antagoniste du même isolat de *T. harzianum* vis-à-vis des *Fusarium* responsables de la pourriture sèche sur des tubercules de pomme de terre. Cette inhibition était plus marquée (près de 93 %) si l'antagoniste était apporté sous forme d'une suspension de spores dans le milieu de culture. L'effet bénéfique du *T. harzianum* a été signalé aussi par Sivan *et al.* (1987) qui ont montré que l'enrobage des semences de tomate à l'aide de cet antagoniste a réduit de 80 % l'attaque de la fusariose des racines et du collet de la tomate.

D'après nos résultats, nous constatons que *Trichoderma* a montré leur effet antifongique vis-à-vis les isolats testés, qui varie en fonction du mode de traitement, concentration de l'antagonisme et du temps d'exposition.

A partir de ce résultat, nous pouvons donc suggérer les hypothèses suivantes : (i) Le champignon testé contient des composés volatiles toxiques, (ii) La variabilité des mécanismes d'action du mode de traitement sur les isolats du champignon étudié et (iii) la sensibilité des isolats fongiques testées.

Sous l'hypothèse de la présence des composé toxique, de nombreuses recherches se sont intéressées à la caractérisation des microbes à activité antifongique, A travers la littérature nous pouvons avancer que leur activité antifongique est due à la présence des composées toxiques (principe actif, ainsi que la rapidité de leur effet volatile). Sivan *et al.* (1984) ont déjà démontré le rôle important des chitinases et des β -1, 3 -glucanases de *T. Harzianum* dans le mycoparasitisme. Ces enzymes fonctionnent en brisant les polysaccharides (la chitine et les glucanes) responsables de la rigidité des parois cellulaires

fongiques, détruisant ainsi l'intégrité des parois cellulaires en limitant la croissance de l'agent pathogène. En effet ces enzymes sont nécessaires pour une lyse idéale des parois cellulaires fongiques. De nombreux rapports ont confirmé la capacité de *Trichoderma* sp. pour le contrôle des pathogènes de plantes par mycoparasitisme. Les effets de ces composés sur les champignons phytopathogènes sont la dégradation des parois cellulaires (De La Cruzet *al.*, 1992; Geremia *et al.*, 1993; Harman *et al.*,1993; Lorito *et al.*,1994; Harman *et al.*,1995; Kubicek *et al.*,2001;Brimner et Boland, 2003;Harman *et al.*, 2004;Wang *et al.*,2003; Harighi *et al.*,2007; Reis Almeida *et al.*,2007; Matroudi *et al.*, 2009;Sharma *et al.*, 2009; Lorito *et al.*,2010; Akramiet *al.*,2011). Des études présentées par Jabnoun-Khiaredinne *et al.*(2009) ont montré que des isolats de *V. dahliae* traités avec *Trichoderma* sp. se sont avérés incapables de produire des microsclérotés, cela est probablement dus à la lyse et à l'inhibition de la synthèse de la mélanine.

Dans nos résultats nos avons enregistré une pigmentation claire est apparue autour des colonies de *Botryosphaeria*, lorsque les thalles des deux protagonistes se sont entré en contact directe. Selon Hadjehrar *et al.* (2008) la présence de la zone d'inhibition dans la culture démontre la sécrétion des substances inhibitrices diffusibles dans le milieu par l'isolat de *Trichoderma* sp.

La deuxième hypothèse porte sur La variabilité des mécanismes d'action du mode de traitement sur les isolats du champignon étudié Les deux modes de traitement testés ont montré une activité antifongique, le mode de traitement ensemencement en masse a montré l'effet inibiteur le plus élevé par rapport au modes de traitement par confrontation directe. L'étude de la croissance mycélienne des deux isolats de *Botryosphaeria* confrontés avec l'isolat de *Trichoderma* sp. montre une réduction de la croissance mycélienne par rapport aux témoins. L'ensemencement en masse de *Trichoderma* dans le milieu de culture avec les isolats de *Botryosphaeria* a montré une croissance plus rapide chez les *Trichoderma* sp. que chez ceux de *botryosphaeria*. Après quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'agent antagoniste. le même résultat a été obtenu dans les travaux (Matroudi *et al.*,2009). La croissance rapide de *Trichoderma* est un avantage important pour concurrencer les champignons pathogènes des plantes pour l'espace et des éléments nutritifs (Matroudi *et al.*,2009). Ortiz et Orduz (2000) ont également observé la croissance rapide de *Trichoderma* sp. (4,5 cm de 3-4 jours) comparativement à celle des *Attamyces* sp. (3 à 4 cm en 12 semaines). En effet, l'épuisement des éléments nutritifs engendré par la croissance rapide de l'agent antagoniste va certainement ralentir ou inhiber la croissance mycélienne du pathogène. Avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte contre les champignons

phytopathogènes à l'aide de produits biologiques, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène (Larkin, Fravel, 1999), c'est pourquoi deux test d'activité antagoniste a été réalisé par confrontation entre *Trichoderma* sp et *Botryosphaeria* sp.

Les diamètres moyens de la zone d'inhibition des deux isolats pathogènes testés diminuent proportionnellement avec les concentrations du *Trichoderma*ensemencé dans le milieu de culture. Des résultats similaires ont été enregistrés par Del Rio et al. (2004), ont démontré que la concentration de 3 g.l⁻¹ de l'acide *p*-coumarique inhibe la croissance de *Phaeacremonium chlamydospora* de l'ordre de 50%, alors que Lambert (2011; 2013), a noté que la faible concentration de ce composé (0,082 g.l⁻¹) n'a aucun effet antifongique sur cet agent.

Dans nos résultats aussi nous avons noté que la croissance mycélienne des deux isolats n'a pas été inhibée de la même manière ; cette différence pourrait être expliquée par la différence de sensibilité des isolats testés. En effet, il est connu qu'au sein de l'espèce fongique, il existe une variabilité dans l'agressivité des souches (Laveau et al., 2009).

Selon Larigion 2012, Chez la vigne, les *Trichoderma* sont autorisés à être utilisés dans différents pays en protection des plaies de taille à l'égard de *Eutypa lata* agent causal de l'eutypiose comme la Nouvelle-Zélande, l'Australie et récemment la France.

D'après les résultats cernés par notre étude, il serait intéressant de tester l'efficacité de l'activité antifongique de plusieurs espèces de *Trichoderma* et de tester ces agents sur les plaies de taille , les portes d'entrée de ce type de champignons.

Conclusion

CONCLUSION

Dans cette étude, une caractérisation *in vitro* de souches de *Trichoderma* isolée à partir d de dépérissement du bois d'agrumes présentant une symptomatologie typique divers environnements de a été effectuée, dans le but sélectionner des souches qui pourrons être efficaces dans la gestion des productions agricoles

Cette étude a montré l'effet nettement antagoniste du *Trichoderma* vis-à-vis du *Botryosphaeria* sp. agent responsable de dépérissement de la vigne et quelques essences arboricoles et forestier.

En effet, les essais de confrontations entre *Botryosphaeria* sp. et *Trichoderma* sp que ce soit d'une façon directe sur milieu de culture ou bien ensemencement en masse, ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne du pathogène testé. S'il y a contact direct entre les deux champignons, *Trichoderma* envahit les colonies de *Botryosphaeria* sp. Dans le cas d'ensemencement en masse malgré l'absence d'un contact direct entre les deux champignons, une réduction du diamètre des colonies de *Botryosphaeria*. sp. est observée par rapport au témoin non traité, surtout pour l'isolat *Botryosphaeria*. sp. 2. Cela prouve qu'en plus de son pouvoir mycoparasitaire, *Trichoderma* peut agir par la sécrétion de substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène.

En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial de tester le *Trichoderma* en tant qu'agent de lutte biologique contre les champignons du bois qui menacent la pérennité de plants arboricoles et viticoles, d'autant plus que jusqu'à ce jour aucun traitement n'existe contre ces pathogènes. Il serait intéressant de le *tester in vivo* en badigeonnant les plaies de taille. Que ce soit au niveau fondamental ou appliqué, de la compréhension du phénomène d'interaction plantes-microorganismes, de nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies sur les mécanismes biochimiques, moléculaires et physiologiques qu'exercent le champignon sélectionné (genres : *Trichoderma*) sur les plantes, sont nécessaires pour améliorer nos connaissances dans ce domaine qui reste toujours sous-évalué. Par ailleurs, d'un point de vue appliqué, nous ne disposons pas encore d'informations suffisantes pour concevoir une utilisation efficace et rationnée de ce champignon, en tant que biopesticides. De ce fait, plusieurs expériences complémentaires doivent être réalisées, en l'occurrence, élargir le spectre des plantes hôtes et des pathogènes ; déterminer la dose minimale effectrice du produit et de suivre sa viabilité à longs termes lors du stockage et tester les souches fongiques.

Référence

REFERANCES

Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De La Cruz J., Monte E., Llobell A., (2001) An antifungal exo-a-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5833-5839

Akrami M., Hadi G., Ahmadzadeh M., (2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10: 2653-2658.

Amreen T, Kumar VBS., (2012) In vitro evaluation of native *Trichoderma harzianum* against major fungal pathogen of flower and fruit crops. *Environment and Ecology* 30: 1039-1041

Baggiolini M. (1952). Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Romande d'Agriculture et d'Arboriculture*, 8:(1) 4-6.

Belkassam A., Zellagui A., Gherraf N., Lahouel M. and Rhouati,S. (2011). Essential Oil Composition of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L. and its Antibacterial Effects on Microorganisms Responsible for Respiratory Infections. *Adv. Nat. & Appl. Sci*, 5: (3), 264-268.

Benítez G., González-Tejero M.R. and Molero-Mesa J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J. Ethnopharmacol.*, 129: 87-105.

Benitez T., Rincon A. M., Limon M. C., Codon A. C., (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. *Int. Microbiol.*, 7: 249-260

Berraf, A, Peros, JP (2005) Importance of *Eutypa dieback* and *esca* in Algeria and structure of the associated fungal community *J Int Sci Vigne Vin* 39: 121-128

Bertsch C., Larignon P., Farine S., Clement C. and Fontaine F. (2009). The Spread of Grapevine Trunk Disease. *Science*, 324: 721-721.

Bissett J (2004) Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html

Bissett J., (1991) A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J.Bot.*, 69: 2357-2372

Brimner T. A., Boland G. J., (2003).A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 100: 3-16.

Brown-Rytlewski, D.E. & McManus, P.S (2000) Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. *Plant Disease*, 84: 1031–1037

Brunner K., Peterbauer C.K., Mach R. L., Lorito M., Zeilinger S., Kubicek C. P., (2003) The Nag1 *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol *Current. Genetics*, 43: 289-295

Calistru C., McLean M., Berjak P., (1997) In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137: 115-124

Carter MV (1991) The status of *Eutypa lata* as a pathogen. Monograph. Phytopathological Paper No. 32, International Mycological Institute, Egham, UK

Casieri L., Hofstetter V. Viret O. and Gindro K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48 :(1)73-8.

Castro A. M., Pedro K. C., Cruz J. C., Ferreira M. C., Leite S. G., Pereira N., (2010) *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant b-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162:2111–2122

Chaverri P., Castlebury L. A., Samuels G. J., Geiser D. M (2003) Multilocus phylogenetic structure of *Trichoderma harzianum*/Hypocrea *lixii* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 27: 302-313

Chiarappa L (1959) Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathology* 49: 510-519

Chloé M., (2006) Identification et caractérisation fonctionnelle d'un gène codant un facteur de transcription chez la vigne. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux 1 : p 1.

SARAVANAKUMAR, D., VIJAYAKUMAR, C., KUMAR, N. AND SAMIYAPPAN, R., (2007) PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.* 26(4):556-565.

Cobos, R., Barreiro, C., Mateos, R. M. & Coque, J. J. R (2010) Cytoplasmic-and extracellularproteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Science*: 46

- Coombe B. G.; Dry P. R. (1988).** Viticulture Vol. 2 Practices. Ed. Winetitles, Adelaide.
- Cortesi P, Milgroom MG (2001)** Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Journal of Plant Pathology* 83: 79-86
- Creaser ML, Wicks TJ (2004)** Short-term effects of remedial surgery to restore productivity to *Eutypa lata* infected vines. *Phytopathol Mediterr* 43: 105-107
- Crous P.W., Swart L. and Coertze S. (2001).** The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (3), 464-466.
- De La Cruz J., Hidalgo-Gallego A., Lora J. M., Benitez T., Pintor-Toro J. A., Llobell A., (1992)** Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.*, 206: 859–867
- Degenkolb T., Dohren H. V., Nielsen N. F., Samuels G. J., and Bruckner H (2008)** Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem. Biodivers.*, 5: 671-680
- Del Río Conesa (2002)** Study of Petri Disease in Grapevine. Proposal of a Possible Solution. *Nutri-Fitos: 77-84*
- Djoukeng, J.D., Polli, S., Larignon, P. & Abou-Mansour, E., (2009)** Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*: 303–308
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E., Chaverr, I. P., Overton, B.E., Samuels, G.J (2002)** Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma anamorphs*. –*Mycological Progress* 1: 409-428
- Dubey S.C., Suresh M., Singh B., (2007)** Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f sp. *Ciceris* for integrated management of chickpea wilts. *Biol. Contr.*, 40: 118-127
- Dubos B. (1987).** Mise au point sur les maladies de dépérissement dans le vignoble français *Le Progrès Agricole et Viticole* **104: 135-141.**
- Dubos B. (1999_a).** Incidence économique de l'Eutypiose dans un vignoble de grand cru de Bordeaux, *Phytoma, la défense des végétaux* 467: pp 15-18.

- Dubos B. (2002).** Maladies cryptogamiques de la vigne. 207p. Bordeaux, Editions 13 Féret.
- Eichhorn K. and Lorenz H. (1977).** Phaenologische entwicklungsstadien der rebe. Nachrbl. Dtsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 29: 119-120.
- Elad Y., (2000)** Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop. Prot., 19: 709-714
- Emilie B, (2013)** Etude comparative des communautés fongiques et bactérienne colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'Esca. Thèse doctorat de l'université de Bordeaux 2 : p 15.
- Enjalbert .H.,1975.** Histoire de la Vigne et du vin, l'avènement de la qualité: Bordas.
- Eziashi E. I., Uma N. U., Adekunle A. A., Airede C. E., (2006)** Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. African Journal of Biotechnology, 5: 703-706
- Ferreira JHS, Matthee FN, Thomas AC (1991)** Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonist strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81: 283-287
- Fourie P. and Halleen F. (2006).** Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. European Journal of Plant Pathology, 116: (4) 255–265.
- Fourie PH, Halleen F (2002)** Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Austral Plant Pathol* 31: 425-426
- Fourie PH, Halleen F, Vyver Jvd, Schreuder W (2001)** Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathol Mediterr* 40: S473-S478
- Fourie PH, Halleen, F., (2005)** Integrated strategies for proactive management of grapevine trunk diseases in nurseries. *Phytopathol Mediterr* 44: 111
- Freeman S., Minz D., Kolesnik I., Barbul O., Zreibil A., Maymon M., Nitzani Y., Kirshner B., Rav-David D., Bilu A., Dag A., Shafir S., Elad Y., (2004)** *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea*, and survival in strawberry. Eur. J. Plant Pathol., 110: 361-370
- Fujita T., Okuda M., Iida A., Uesato S., Nagaoka Y., Takaishi Y., Terada H., (1994)** Fungal metabolites. The effect of peptide antibiotics tricosporin, on the respiratory activity of mitochondria. Biol. Pharm. Bull., 17: 482-484
- Galet P. (2000).** Dictionnaire encyclopédique des cépages (Hachette).

- Gary C., Brisson N., Gaudillere JP. and Duarte M. (2003).** Modélisation d'une espèce ligneeuse pérenne à fruits charnus: la Vigne. Séminaire STICS, Arles: 36-37.
- Geremia R. A., Goldman G. H., Jacobs D., Ardiles W., Vila S. B., Van Montagu M., Herrera-Estrella A., (1993)** Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, *Mol. Microbiol.*,8: 603-613
- Gond S. K., Verma V. C., Kumar A., Kumar V., Kharwar R. N., (2007)** Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correeae (Rutaceae) from Vanasi (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 1371–1375
- Graniti A (1960)** Il “mal dell’esca” della vite in Puglia. *Ital Agric* 97: 543-550
- Grasso S (1969)** Il “mal dell’esca” della vite (*Phellinus ignarius* Patouillard) in Sicilia. *Tecnica Agric (Catania)* 21: 204-212
- Grasso S (1984)** Infections of *Fusarium oxysporum* and *Cylindrocarpon destructans* associated with a decline of young grapevine plants in Sicily. *Informatore Fitopatologico* 34: 59-63
- Gugino BK, Travis JW (2003)** Suppression of *Cylindrocarpon destructans* utilizing compostes soil amendments. *Phytopathology* 93: S31
- Hajieghrari B., Giglou M. T., Mohammadi M. R., Davari M., (2008).** Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7: 967-972.
- Harighi M. J., Zamani M. R., Motallebi M., (2007).** Evaluation of antifungal activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220, *Biotechnology*, 6: 28-33.
- Harman G. E., (2006)** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96:190-194.
- Harman G. E., Hayes C. K., Lorito M., Broadway R. M., Di Pietro A., Peterbauer C. K., Tronsmo A., (1995).** Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 83: 313–318.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., (2004).** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:43-56.
- Harman G. E.,(2011)** *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39:103-108
- Herlemont B. (2004).** Contexte réglementaire de l'interdiction de l'arsénite de sodium

- Howell C. R.,(2003)** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, 87: 4-10
- Huglin A.S. and Chneider C. (1998)** Biologie et écologie de la vigne.Tech et doc, Paris.
- Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M., (2009).** Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. *Afr. J. Plant Sci. Biotechnol.* 3:27-36
- Jayalakshmi S. K., Raju S ., Usha Rani S., Benagi V.I., Sreeramulu K., (2009)** *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea 121(*Cicer arietinum L.*) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*. *Australian Journal of Crop Science*, 3: 44-52
- John S, Wicks TJ, Hunt JS, Lorimer MF, Oakey H, Scott ES (2005)** Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Austral Plant Pathol* 34: 569-575
- Johnson.H.,1990.** Une histoire mondiale du vin de l'antiquité à nos jours: Hachette.
- Jonhston A. and Booth C. (1983).** Plant pathologist pocket book, 2nd Ed Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 439p.
- Jousse C. (2004)** La recherche de molécules ambimobiles pour lutter contre les maladies du bois, Rencontre Technique : Les maladies du bois en Midi-Pyrénées (Station Régionale ITV Midi-Pyrénées), pp. 37.
- Kambouche, N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed A., Dicko A., Derdour A., Younos C. and Soulimani R.(2008).** Chemical composition and antioxidant Potential of *Ruta Montana L.* Essential Oil from Algeria. *J. Med. Food*, 11, 593-595.
- Kotze C, Niekerk Jv, Halleen F, Mostert L, Fourie P (2011)** Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathol Mediterr* 50: 247-263
- Kouyeas H (1978)** *Eutypa armeniacae* on lemon in Greece. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* 91: 235-237
- Kubicek C. P., Mach R. L., Peterbauer C. K., Lorito M., (2001).** *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 83: 11-23

Kuntzmann, P., Villaume, S., Larignon, P. & Bertsch, C (2010) Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis*, 49(2):71–76

Lambert C.(2011).Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois, Doctorat en Sciences, Technologie, Santé Option: Oenologie.Université Bordeaux Segalen,France .

Lambert C., Buisson J., Waffo-Teguo P., Papastamoulis Y., Richard T., Corio-Costet M.F., Merillon J.M. and Cluzet S. (2013). Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the Botryosphaeriaceae family. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60: 11859-11868.

Lambert Carole, (2011) Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois : p 17.

Landreau A., (2001) Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Thèse Doct. Pharmacie, Univ. Nantes, France, 201

Larignon P, Coarer M, Girardon K, Berud F, Jacquet O (2009) Propagation of pioneer fungi associated with esca disease by vegetative material in French grapevine nurseries.

Larignon P, Dubos B (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine *Eur J Plant Pathol* 03: 147-157

Larignon P. (2006). Maladies du bois de la vigne. Quelques éléments sur la présence des champignons associés, leur localisation dans le bois et les moments de contaminations, *Phytoma* 592: 14-17.

Larignon P. (2008). Rôle du matériel végétal dans la propagation des champignons associés aux maladies du bois IFV p53.

Larignon P. (2009). Le point sur les maladies du bois: symptomatologie, cycles biologiques,influence des facteurs environnementaux, bilan des recherches et perspectives, *Matinées Techniques du BIVB : Mieux comprendre les maladies du bois*, p30.

Larignon P. (2012). Maladies cryptogamiques du bois de la vigne : symptomatologie et agents pathogènes.

Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. & Dubos, B (2001) Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 336

Laveau C., Letouze A., Louvet G., Bastien S. and Guerin-dubrana I. (2009). Differential Aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia mediterranea* 48: 32-46.

Le gall, D., and Le gat, Y. (1994). Évaluations de la nuisibilité de l'eutypiose au vignoble. Annales AN.P.P. (Association nationale de protection des plantes), 4e conférence Internationale sur les maladies des plantes. Du 6 au 8 décembre 1994, Bordeaux, France. AN.P.P., Paris. Tome III. p. 1271-1284.

Lecomte, P., Darrieutort G., Dfives, A., Louvet, G., Liminana, J.M. & Blancard, D (2006) Observations of Black Dead Arm symptoms in Bordeaux vineyards: evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal necroses hypotheses. *IOBC WPRS Bulletin* 29: 93-94

Lee J, Huh N, Hong JH, Kim BS, Kim GH, Kim JJ (2012) The antagonistic properties of *Trichoderma spp.* inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. *Holzforschung* 66: 883-887

Leuchtman A., Petrini O., Samuels G (1996) Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88: 384-394

Lieckfeldt E., Samuels G. J., Börner T., Gams W (1998) *Trichoderma koningii*: neotypification and *Hypocrea teleomorph*. *Can. J. of Bot.*, 76: 1507-1522

Lorito M., Harman C. K., Di Pietro A., Woo S. L., Harman G. E., (1994) Purification, characterization and synergistic activity of a gulacan 1,3-beta glucosidase and an *N*-acetylglucosaminidase from *Trichoderma harzianum*, *Phytopathology*, 84: 398-405

Lorito M., Woo S. L., Harman G. E., Monte E., (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 48:395-417.

Lorrain B, Ky I, Pasquier G, Jourdes M, Dubrana LG, Geny L, Rey P, et al. (2012) Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Aust J Grape Wine Res* 18: 64-72

Maher N, Piot J, Bastien S, Vallance J, Rey P, Guerin-Dubrana L (2012) Wood necrosis in Esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *J Inter Sci Vigne Vin* 46: 15-27

Mahesh B., Tejesvi M. V., Nalini M. S., Prakash H. S., Kini K. R., Subbiah V., Shetty H.S., (2005) Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Curr. Sci.*, 88: 218-219

Maluta DR, Larignon P (1991) Pied-noir:mieux vaut prévenir. *Viticulture* 11: 71-72

- Martos, S., Andolfi, A., Luque, J., Mugnai, L., Surico, G. & Evidente, A (2008)** Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology*: 451–461
- Mohamed-Benkada M., (2006)** Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles: substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse de Doct., Univ. Nantes, France:139
- Monte E., Liobell A (2003)** *Trichoderma* in organic agriculture, Proceedings V World Avocado Congress: 725-733
- Nascimento T, Rego C, Oliveira H (2007)** Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathol Mediterr* 46: 125-125
- Nikam P. S., Jagtap G. P., Sontakke P. L., (2007).** Management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporium* f. sp. Ciceri. *African Journal of Agricultural Research*, 2: 692-697.
- Noronha E. F., Ulhoa C. J., (1996)** Purification and characterization of an endo- β -glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, 42: 1039-1044
- Octave S, Amborabe BE, Luini E, Ferreira T, Fleurat-Lessard P, Roblin G (2005)** Antifungal effects of cysteine towards *Eutypa lata*, a pathogen of vineyards. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 1006-1013
- Olejnikova P., Hudecova D., Burgstaller W., Krystofova S., Varecka L., (2011)** Transient excretion of succinate from *Trichoderma atroviride* submerged mycelia reveals the complex movements and metabolism of carboxylates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100: 55-66
- Paillassa E, Dubos B, Larignon P, Chevrier JC (1992)** Infectious inoculum of *Eutypa lata*. Its formation, development and dispersal: contributing factors. *Phytoma*: 21-23
- Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D. and Dixit S.N. (1982).** Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris* Roxb. (Compositae). *Angerwandte Botanik*, 56: 256-257.
- Papavizas G. C., (1985)** *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and the potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23: 23-77
- Patel J. J., et Brown M. E., (1969).** Interactions of *Azobacter* with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant and soil*, 31: 273-281.

- Péros J.P. and Berger G. (1994).** A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa dieback*", *Agronome*, 14:515-523.
- Peros J.P. and Berger G. (1999).** Diversity within natural progenies of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Current Genetics* 36: 301-309.
- Phillips A.J.L. (2002).** *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3–18.
- Phillips, AJL (1998)** *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excorescence and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology*, 146:327–332
- Pitt, W., Huang, R., Steel, C.C. & Savocchia, S (2010)** Identification, distribution and current taxonomy of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16:258–271
- Ramos DE, Moller WJ, English H (1975)** Production and dispersal of ascospores of *Eutypa armeniaceae* in California. *Phytopathology* 65: 1364-1371
- Rego C, Farropas L, Nascimento T, Cabral A, Oliveira H (2005)** Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathol Mediterr* 44: 118-119
- Rego C, Oliveira H, Carvalho A, Phillips A (2000)** Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathol Mediterr* 39: 76-79
- Reis Almeida F. B., Cerqueira F. M., Nascimento R. S., Ulhoa C. J., Lima A. L., (2007).** Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.*, 29: 1189–1193
- Rifai M. A (1969)** A revision of the genus *Trichoderma*, *Mycol. Pap.*, 116: 1-56
- Romanazzi G, Murolo S, Pizzichini L, Nardi S (2009)** Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *Eur J Plant Pathol* 125: 277-290
- Rooney S. and Gubler W.D. (2001).** Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, 40:(3), 467–472.
- Ruocco M., Lanzuise S., Vinale F., Marra R., Turra D., Woo S.L., Lorito M., (2009)** Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC

transporter membrane pump in the interaction with different plant–pathogenic fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22: 291-301

Samuels G. J (2006) *Trichoderma*: systematics, the sexual state and ecology. *Phytopathology*, 96:195-206

Schmidt CS, Lorenz D, Wolf GA (2001) Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: Screening of bacterial antagonists. *J Phytopathol-Phytopathol Z* 149: 427435

Schuster A., Schmoll M., (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87:787-799

Sentenac G. (2004). Evaluation de l'efficacité de fongicides et d'agents biologiques utilisés dans la lutte contre les maladies du bois Esca et BDA. Premiers résultats d'expérimentations menées sur le terrain », Rencontre Technique: Les maladies du bois en Midi-Pyrénées (Station Régionale ITV Midi-Pyrénées), 28-33.

Sharma K., Mishra A. K., Misra R. S., (2009). Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of *Trichoderma harzianum* Isolates for their Efficacy as Biocontrol Agents. *J. Phytopathol.*, 157: 51 -56.

Siameto E. N., Okoth S., Amugune N. O., Chege N. C., (2011). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma harzianum* from embu district, kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13: 81-90.

SILVA G, H., COSTA J.N , CAMPOS V.P, OLINIERA D.F., PFENNING L.H,(2001) Fungal metabolites wilt-activity against nematodes. *Bioactive Fungal Metabolites. Impact and Exploitation, Internationala symposium.Br. Mycolog.Soc., Wales Swansea, UK, pp:95.*

Sivan A., Chet I., (1989) The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathol.*, 79: 198-203

Sivan A., Elad Y., Chet I., (1987). Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 74: 498-501.

Sosnowski M.R., Lardner R., Wicks T.J. and Scott E.S. (2007). The influence of grapevine cultivar and isolate of *EutypaLata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease* 91: 924-931.

Spagnolo, A., Marchi, G., Peduto, F., Phillips, A.J.L. & Surico, G (2011) Detection of Botryosphaeriaceae within grapevine woody tissue by nested PCR, with particular emphasis

- Stevenson D. M., Weimer P. J., (2002)** Isolation and characterization of a *Trichoderma* strain capable of fermenting cellulose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 721-726
- Surico G., Marchi G., Braccini P. and Mugnai L. (2000).** Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39 (1):190-205.
- Tabbachi R., Fkyerat A., Poliard C. and Dubin G.M. (2000).** Phytotoxine from fungi of Esca of grapevine, *Phytopathology* ", *Méditerranéenne*. 39: pp159-161.
- Tuao Gava CA, Leal Menezes ME (2012)** Efficiency of *Trichoderma* sp isolates on the control of soil-borne pathogens in the yellow melon. *Revista Ciencia Agronomica* 43: 633-640
- Urbez-Torres J. R., Battany M., Bettiga L. J., Gispert C., MCGourty G., Roncoroni J. and Smith R. J. (2010).** Botryosphaeriaceae Species Spore-Trapping Studies in California Vineyards. *Plant Disease* 94: 717-724.
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. & Gubler, W. D (2006)** Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease*, 90: 1490-1503
- Van Niekerk, J. et al (2006)** *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 43–54.
- Van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Halleen, F. & Crous, P.W (2004)** DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96: 781
- Viala P. (1926).** Esca .*Anales des epiphyties*.pp180.
- Vinale F., Ghisalberti E. L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S., Lorito M., (2009)** affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48:705-711
- Vining L.C., (1990)** Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44: 395-42
- Viret O., Keller M., Jaudzems V. G. and Cole F. M.(2004).** Botrytis cinerea infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* 94 (8), 850–857.

Viterbo A., Ramot O., Chemin L., Chet I., (2002) Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Leeuwenhoek*, 81: 549-55

Waite H, Morton L (2007) Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathol Mediterr* 46: 5-17

Weber EA, Trouillas FP, Gubler WD; (2007) Double pruning of grapevines: A cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. *Am J Enol Vitic* 58: 61-66

Wenneker M, Vink P, Van Bruggen AS (2006) *Eutypa* dieback as an important (new) disease in red currant (*Ribes rubrum*) in The Netherlands. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 71: 881-885

Whitelaw-Weckert MA, Nair NG, Lamont R, Alonso M, Priest MJ, Huang R (2007) Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpum liriodendri* in Australia. *Austral Plant Pathol* 36: 403-406

Whiteman SA, Jaspers M, Stewart A, Ridgway JJ (2004) *Phaeomoniella chlamydospora* detection in the grapevine propagation process by species-specific PCR. *Phytopathol Mediterr* 43: 156

Wicks T. and Creaser M. (2001). Yearly variation in *Eutypa* dieback symptoms and the relationship to grapevine yield. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 452: 50–52.

Widden P., Scattolin V (1988) Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* spp. colonizing spruce. *Mycologia*, 80: 795-803

Annexe

ANNEXE

Milieu PDA (POTATO Dextrose Agar):

- Pomme de terre 200g
 - Dextrose 20g
 - Agar 20g
 - Eau distillée 1000ml
1. Nettoyer la pomme de terre
 2. Découper les pommes de terre en des cubes
 3. Placer les dans un (1) litre d'eau
 4. Faire bouillir
 5. Filtrer et récupérer le jus
 6. Mettre l'agar
 7. Ajuster jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée
 8. Remuer jusqu'à dissolution totale
 9. Stériliser 20 mn à 120 °C