

MASTER FAGE
Biologie et Écologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité :
FGE Agroécologie

Extrait du Mémoire de stage :

Évaluation de l'efficacité des préparations à base de Prêle des champs (*Equisetum arvense*) dans des vignobles biodynamiques contre la *Plasmopara viticola*

Soutenu par :
Maryna BOGDANOK

A Nancy, le 01/09/2015

Maître de stage :
Pierre Masson, Président de l'Association Soins de la Terre

Tuteur universitaire :
Séverine Piutti

Siège social
Association Soins de la Terre
71250, Château



RESUME

Dans le contexte actuel des discussions portant sur la limitation des traitements cupriques en agriculture biologique et biodynamique, les préparations à base de plantes constituent des voies alternatives dans les stratégies de lutte des vignerons contre les maladies fongiques de la vigne. L'Association Soins de la Terre pour la recherche sur les pratiques en agriculture biodynamique et BioDynamie Services développent des préparations biodynamiques à base d'*Equisetum arvense*, en particulier, afin de permettre aux praticiens de la biodynamie de substituer le cuivre. La décoction de prêle des champs simple et sa décoction fermentée ont montré leur efficacité contre l'agent pathogène *Plasmopara viticola* en diminuant sa capacité de germination et donc sa dispersion. La décoction simple d'*Equisetum arvense* semble diminuer également l'entassement de la végétation de la vigne et donc sa sensibilité au mildiou. Néanmoins, les connaissances scientifiques actuelles ne permettent pas d'expliquer cet effet de la préparation, d'autant que la matière active du traitement (la prêle sèche) constitue seulement 300 g/ha. Dès lors, des expériences complémentaires doivent être mises en place afin d'étudier l'interaction entre la décoction de prêle biodynamique et le comportement végétatif de la vigne. D'autre part, une utilisation de méthodes d'analyses dites holistiques, notamment la Morpho-Chromatographie, permettrait de mieux connaître tant la substance analysée que ses effets possibles sur la vigne et sur le pathogène.

Ce stage avait pour but l'étude et la validation par des essais biologiques, dans le cadre d'un pré-essai, des intuitions des vignerons en biodynamie concernant l'emploi des préparations à base de prêle des champs contre le mildiou de la vigne en y utilisant des indicateurs « analytiques » et « holistiques ». Une attention particulière a été portée sur la compréhension des méthodes holistiques et la nécessité de leur emploi dans la recherche en agriculture biodynamique. Une analyse bibliographique effectuée a également permis d'approcher le sujet d'étude dans son globalité et de proposer des hypothèses concernant le mode d'action des préparations à base d'*Equisetum arvense*.

ABSTRACT

In the current context of discussions on limitation of copper treatments in organic and biodynamic agriculture, plant-based preparations are alternative ways in the winemakers' strategies against fungal diseases of grapevines. The Earth Care Association for research on practices in biodynamic agriculture and BioDynamie Services Ltd develop biodynamic preparations using horsetail (*Equisetum arvense*), in particular, to allow practitioners of biodynamics to substitute copper. The simple decoction of horsetail and the fermented decoction of horsetail have proved effectiveness against the pathogen *Plasmopara viticola* by reducing its ability to germinate and thus its dispersion. The simple decoction of *Equisetum arvense* also appears to reduce the canopy density of grapevines and therefore its susceptibility to downy mildew. However, current scientific knowledge does not explain the effect of the preparations, especially as the active ingredient of treatment (dry horsetail) is only about 300 g/ha. Therefore, additional experiments should be set up to study the interaction between biodynamic horsetail decoction and vegetative behavior of the grapevine. Furthermore, the use of so-called holistic methods of analysis, including the Morpho-Chromatography, would help us to understand both the test substance, and its possible effects on the grapevine and on the pathogen as well.

The internship aimed to study and to validate the intuitions of biodynamic winemakers regarding the use of preparations based on horsetail against the downy mildew by use of bioassays with "analytic" and "holistic" indicators in a context of pre-test. Particular attention was paid to the understanding of holistic methods and the need for their application in biodynamic agriculture research. A conducted literature analysis also allowed to approach the subject of study in its entirety and to propose hypotheses about the mode of action of preparations of *Equisetum arvense*.

SOMMAIRE

RESUME	2
ABSTRACT	2
REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS	6
LISTE DES TABLES	7
1 ^{ère} PARTIE : CONTEXTE DE L'ETUDE	8
<i>Présentation de l'Association Soins de la Terre</i>	8
<i>Introduction</i>	8
I. Le paradigme de l'agriculture biodynamique et son regard envers les maladies des plantes	9
II. Réflexions sur la mise en place du cadre de l'étude	11
2 ^{ème} PARTIE : ETAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES	13
I. Le modèle d'étude vigne/ <i>Plasmopara viticola</i>	13
1.1. Mildiou de la vigne (<i>Plasmopara viticola</i>)	13
1.2. Les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes	14
1.3. Les réactions de défense de la vigne contre le mildiou	15
II. La prêle des champs (<i>Equisetum arvense</i>) et ses effets potentiels contre le mildiou de la vigne	15
2.1. Les vertus de la prêle des champs (<i>Equisetum arvense</i>)	15
2.2. L'acide silicique et les maladies des plantes	16
III. Vigueur de la vigne et sa sensibilité aux attaques du <i>Plasmopara viticola</i>	17
IV. Une approche holistique pour caractériser l'état intrinsèque de la vigne	18
3 ^{ème} PARTIE : MATERIELS ET METHODES	20
I. Germination des oospores du mildiou dans des conditions contrôlées	20
1.1. Problématique	20
1.2. Caractéristiques pédoclimatiques du site d'essai	20
1.3. Préparation des échantillons et hivernage	20
1.4. Incubation des oospores	21
1.5. Dispositif expérimental et modalités de l'essai	21
1.6. Mesures et traitements de données	21
II. Essai en plein champ	21
2.1. Problématique	21
2.2. Caractéristiques pédoclimatiques des sites de l'essai	22
2.3. Déroulement de l'expérimentation	22
2.4. Dispositif expérimental et modalités de l'essai pour l'évolution de l'effet des préparations sur le mildiou de la vigne	22
2.5. Mesures et traitements des données : notation du mildiou de la vigne	23

2.6.	Dispositif expérimental et modalités de l'essai pour l'étude de l'effet des préparations sur la vigueur de la vigne.....	24
2.7.	Mesures et traitements des données: estimation de la vigueur de la vigne	25
2.7.1.	Surface foliaire.....	25
2.7.2.	Densité du couvert végétal.....	26
2.7.3.	Indice de statut azoté de la vigne	27
2.7.4.	Analyse de données concernant la vigueur de la vigne	27
III.	Formation des chromatogrammes à partir des feuilles des vignes.....	27
IV.	Récapitulatif de variables étudiées lors de l'étude	28
4 ^{ème}	PARTIE : RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS DE DONNEES	29
I.	Germination des oospores dans des conditions contrôlées	29
1.1.	Nombre total de sporanges produits	30
1.2.	Temps nécessaire pour les premières germinations des oospores	32
1.3.	Efficacité des traitements : formule d'Abbott	32
1.4.	Conclusions : germination des oospores dans des conditions contrôlées.....	33
II.	Vigueur de la vigne	33
2.1.	La surface foliaire	33
2.2.	Densité du couvert végétale.....	35
2.3.	Indice de statut azoté de la vigne.....	36
2.4.	Conclusions : vigueur de la vigne et sensibilité de celle-ci au mildiou.....	37
III.	Interprétation des chromatogrammes des feuilles de la vigne	38
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	40
	LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41
	ANNEXES	47
I.	Résultats des recherches portant sur l'agriculture biodynamique.....	47

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon maître de stage, Pierre Masson pour son soutien, sa confiance, et les connaissances qu'il m'a transmises. De plus, je remercie Vincent Masson pour son aide durant mon stage et pour mon intégration dans son travail d'équipe, Encarna Cuevas qui m'a beaucoup conseillée sur les indicateurs de la vigueur de la vigne, Georg Meissner qui a été disponible pour répondre à mes questions à propos de la méthodologie, Yves Le Roux d'avoir été très disponible pour les analyses statistiques et Séverine Piutti pour le suivi de mon travail.

Merci aux adhérents de l'Association Soins de la Terre pour leur bonne humeur, la gentillesse avec laquelle ils ont accepté que nous menions nos études sur leurs parcelles, et leur grande disponibilité. Merci à tous les membres de BioDynamie Services qui m'ont permis de m'intégrer facilement à l'équipe et de passer 6 mois très agréables.

Je tiens à remercier également Marie Darnand de la Société de viticulture du Jura pour m'avoir accompagné dans les notations de la germination des oospores du mildiou ainsi que Dr. K Perumal pour son initiation à la méthode de la Morpho-chromatographie.

Il est pour moi temps de continuer ma route vers ce qui est beau et juste. Merci à tous ceux qui m'ont aidée et soutenue pendant la durée de mon stage.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1: Une vue triangulaire de méthodes de recherche (à droite: méthode holistique, à gauche: méthode conventionnelle)</i>	12
<i>Figure 2: Chromatogrammes réalisées par Pfeiffer (1984) A: graine de blé (94% de germination); B: graine de blé exposée à la température, absence de germination</i>	18
<i>Figure 3: Description des notions utilisées lors de la lecture d'un chromatogramme</i>	19
<i>Figure 4: Tube à mildiou (dimensions du tube 30 à 50 cm de longueur et 5 à 10 cm de diamètre environ)</i>	20
<i>Figure 5: Une représentation schématique du dispositif expérimental du départ</i>	23
<i>Figure 6: Une représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour les analyses statistiques de données</i>	23
<i>Figure 7: Plasmopara viticola: pourcentage de surface foliaire atteinte</i>	24
<i>Figure 8: Une représentation schématique du dispositif expérimental</i>	25
<i>Figure 9: Illustration d'un papier filtre pour l'expérience.....</i>	27
<i>Figure 10: Évolution de la germination des oospores du Plasmopara viticola pendant le période de l'essai</i>	29
<i>Figure 11: Boîtes à moustaches du nombre total de sporanges produits par dix fragments de 2 mm² par traitement et par bloc</i>	30
<i>Figure 12: Description des résidus du modèle pour l'analyse de la variable i.e. le nombre total de sporanges produits</i>	30
<i>Figure 13: Interactions entre les facteurs de la variable étudiée</i>	31
<i>Figure 14: Comparaisons multiples des moyennes (issues du test paramétrique) de la variable étudiée</i>	31
<i>Figure 15: Comparaison multiples des moyennes (test non paramétrique) de la variable étudiée</i>	31
<i>Figure 16: Boîtes à moustaches du temps des premières germinations des oospores (jours) par traitement et par bloc</i>	32
<i>Figure 17: Interaction entre les facteurs (à gauche) et les résultats du test de Tukey : groupes homogènes (à droite) de la variable étudiée i.e. le temps des premières germinations des oospores ..</i>	32
<i>Figure 18: Boîtes à moustaches d'efficacité des traitements par rapport au témoin non-traité par traitement et par bloc</i>	32
<i>Figure 19: Boites à moustaches de surface moyenne d'une feuille principale par bloc et par traitement (cm²)</i>	33
<i>Figure 20: Boites à moustaches de surface totale des feuilles par bloc et par traitement (m²/m² du sol)</i>	34
<i>Figure 21: Boites à moustaches du rapport de la surface totale des entre-cœurs sur la surface totale par bloc et par traitement, %</i>	34
<i>Figure 22: Description des résidus du modèle</i>	34
<i>Figure 23: Comparaisons multiples des moyennes de la variable étudiée (i.e. la part des entre-cœurs dans la végétation, %)</i>	34
<i>Figure 24: Représentation graphique des valeurs des variables étudiées : a) le pourcentage des trous dans la végétation, % ; b) le nombre de niveaux de feuilles dans la végétation ; c) le pourcentage des feuilles inférieures dans la végétation</i>	35
<i>Figure 25: Description graphique des données (indice de statut azoté de la vigne).....</i>	36
<i>Figure 26: Chromatogrammes à partir des feuilles des vignes provenant de la parcelle Chardonnay B</i>	38

LISTE DES TABLES

<i>Tableau 1: Paradigme de l'agriculture biodynamique par rapport aux autres types d'agriculture (d'après Lorand, 1996).....</i>	<i>10</i>
<i>Tableau 2: Résultats de certaines recherches portant sur l'effet du Si sur des maladies fongiques (d'après Romero et al., 2011).....</i>	<i>16</i>
<i>Tableau 3: Résultats d'estimation des coefficients propres aux parcelles d'étude.....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 4: L'ensemble des variables étudiées lors de l'essai.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 5: Mesure de la surface foliaire moyenne d'une feuille principale, de la surface foliaire totale par souche et par m² de sol, de la part des entre-cœurs par les modalités étudiés (moyenne générale).....</i>	<i>33</i>
<i>Tableau 6: Facteurs ayant un effet sur l'indice azoté de la vigne.....</i>	<i>37</i>

1^{ère} PARTIE : CONTEXTE DE L'ETUDE

Présentation de l'Association Soins de la Terre

L'Association Soins de la Terre pour la recherche sur les pratiques en agriculture biodynamique résulte de la fusion des idées et des moyens de deux inspirateurs de l'agriculture biodynamique, Pierre Masson et Ulrich Schreier en 2015. Aujourd'hui les adhérents de l'association sont tant des particuliers que des professionnels. Ses missions sont multiples et vont de la recherche dite paysanne en agriculture biodynamique, seule ou en partenariat avec des universitaires (par exemple, avec l'Université de Geisenheim) ou d'autres institutions, à la mise au point de méthodes dites sensibles dans le laboratoire qu'ils sont parvenus à mettre en place. Le développement de méthodes peu coûteuses pour l'évaluation des sols, des composts et des préparations biodynamiques est un objectif majeur de l'association. En complément de l'observation du terrain et des analyses chimiques, les analyses de bio-électronique de Louis-Claude Vincent et les morpho-chromatographies (méthodes sensibles), complètent les résultats des études menées.

Plusieurs essais sont déjà en cours. On peut citer parmi eux la comparaison de différents systèmes de dynamisation des préparations (en partenariat avec BioDynamie Services et Demeter France), l'emploi de préparations à base de prêle des champs sous différentes formes et son effet préventif contre les maladies cryptogamiques, l'incinération de graines d'adventices, la conservation et le vieillissement des préparations biodynamiques, les dates de passage de la silice de corne (501) en vigne, la recherche des moyens de régénérescence de la vigne.

Les résultats obtenus suite à ses expérimentations ne donnent pas lieu à des publications scientifiques. Néanmoins, ils ont une valeur pratique non seulement pour les adhérents de l'Association, mais aussi pour tous les praticiens de la biodynamie, car la recherche institutionnelle en France n'a pas pour le moment pour but de répondre aux problématiques des groupes minoritaires des paysans. En conséquence, le but l'Association est de transmettre leurs résultats à ceux qui cherchent à comprendre et à pratiquer l'agriculture biodynamique.

Introduction

Le vignoble français représente environ 788 700 ha (2010). La valeur de la production viticole (hors subventions) est estimée par l'INSEE en 2013 à 10,32 milliards d'euro soit 24 % des 42,3 milliards d'euros générés par les produits végétaux bruts et transformés et 14 % des 73,7 milliards d'euros de production agricole totale. La filière représente en France plus de 600 000 emplois directs et indirects. Elle est le 2^{ème} secteur économique exportateur national derrière l'aéronautique et le 1^{er} secteur exportateur agroalimentaire (*France AgriMer*). Pourtant, avec moins de 3% de surface agricole utile (SAU), la vigne représente 20% des usages des pesticides en France (rapporté à la surface cultivée), 80% de ces produits étant des fongicides (<http://observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=378>).

Cette situation est le résultat de l'apparition en France de l'oïdium, du phylloxera et du mildiou au cours du XIXe siècle, car la vigne européenne (*Vitis vinifera*) était incapable de développer une réponse immunitaire satisfaisante faces aux nouveaux pathogènes. Encore aujourd'hui la lutte contre l'oïdium et le mildiou représentent 70% des dépenses de fongicides du secteur.

D'autre part, les consommateurs recherchent de plus en plus les vins produits avec un respect de l'environnement, notamment selon les pratiques biologiques et biodynamiques (Parpinello *et al.* 2015). Pour les amateurs de vin, le vin biodynamique gagne de plus en plus de reconnaissance. Ainsi, le maître de dégustation J. Robinson a noté que « les vins biodynamique, qui sont réussis, ont un goût

différent, ils sont plus sauvages et plus intenses » (McInerney, 2002, cité par Reeve, 2003). Une des preuves visibles de l'essor des vins biodynamiques est l'augmentation de la surface de vignes cultivées en biodynamie, passée en France de 1000 à 15000 ha entre 1993 et 1998 (Meunier, 2001, cité par Reeve *et al.*, 2005).

Pourtant, en viticulture biologique et biodynamique, la protection des vignes dépend fortement du cuivre. En raison des effets néfastes sur les organismes du sol, les quantités de cuivre employées sont limitées (Renella *et al.* 2002). Aujourd'hui, le cahier des charges de l'agriculture biologique fixe une limite maximale de cuivre appliquée à 6 kg/ha/an en moyenne sur 5 ans. Le cahier des charges Demeter vise 3 kg/ha/an en moyenne sur 5 ans (www.demeter.fr). Néanmoins, il faut noter, qu'en l'absence de traitements et dans des conditions climatiques favorables, le mildiou de la vigne peut défavoriser jusqu'à 100% de la récolte de la saison.

Dans le contexte actuel des discussions portant sur la limitation des traitements cupriques en agriculture biologique et biodynamique, les préparations à base de plantes peuvent constituer des voies alternatives contre les maladies fongiques. L'effet de la prêle des champs (*Equisetum arvense*) sur l'agent pathogène du mildiou de la vigne *Plasmopara viticola* a été rapporté dans de nombreux travaux (Chovelon et Baron, 2011 ; Gindro *et al.*, 2007). Pourtant son mode d'action n'est pas encore clair à ce jour. Elle pourrait agir de façon directe sur le pathogène ou de façon indirecte via l'activation des mécanismes de défense de la vigne.

Une étude sur l'effet des préparations à base de prêle des champs, utilisées en agriculture biodynamique sur le mildiou ainsi que sur le comportement de la vigne et la compréhension des mécanismes sous-jacents semble en conséquence nécessaire.

Le sujet du Master est donc d'actualité, car ses résultats permettent d'enrichir l'état des connaissances concernant l'agriculture biodynamique mais aussi de vérifier certaines intuitions des praticiens de la biodynamie concernant l'action de prêle des champs sur les maladies cryptogamiques.

Ainsi, ma mission au sein de l'Association Soins de la Terre a consisté en l'étude et la validation, par des essais biologiques, des intuitions des vignerons en biodynamie concernant l'emploi des préparations à base de prêle des champs. Pour cela, des essais ont été réalisés sur trois parcelles des domaines viticoles (conditions réelles au vignoble). Ces essais sont dits « paysans », et donc sont limités en termes de surfaces et de moyens disponibles. Pour la partie expérimentale de mon stage, ma mission a été de fixer les modalités de traitements ainsi que de les réaliser, de choisir les variables étudiées, de mettre en place des protocoles de suivi et de collecter les données et d'analyser les résultats.

Étant donné que l'Association Soins de la Terre en partenariat avec BioDynamie Services réalise des essais paysans en agriculture biodynamique afin de répondre aux problématiques de terrain de leurs adhérents et clients, nos essais se sont placés dans la catégorie pré-essai afin de confirmer dans un premier temps l'effet d'au moins une préparation à base de prêle des champs sur les variables étudiées, mais aussi afin de donner des pistes de travail pour les années à venir.

I. Le paradigme de l'agriculture biodynamique et son regard envers les maladies des plantes

L'agriculture biodynamique est le premier mouvement d'agriculture alternative organisé dans le monde. Dès 1928, le mouvement de l'agriculture biodynamique a adopté une certification des produits alimentaires, innovation qui a par la suite été reprise par d'autres mouvements. Afin de comprendre les principes de l'agriculture biodynamique, une analyse systémique profonde de ses bases doit être présentée. Le concept de paradigme est donc fondamental pour cela, le paradigme étant l'exposition d'une vision du monde préalable à toute recherche (Reveret *et al.*, 1981).

Selon l'angle théorique adopté par Lorand (1996), un paradigme peut se comprendre comme un ensemble de croyances qui guident l'action. Il peut alors se subdiviser en trois dimensions: l'ontologie, c'est-à-dire la nature de la réalité, l'épistémologie, i.e. la manière d'entrer en relation avec la réalité, et la méthodologie, c'est-à-dire les pratiques développées en regard des deux dimensions précédentes. L'auteur a analysé la littérature de l'agriculture biodynamique en répondant à ces trois questions et les a comparé avec d'autres paradigmes mieux connus à savoir avec ceux de l'agriculture traditionnelle, industrielle et biologique (Tableau 1).

Tableau 1: Paradigme de l'agriculture biodynamique par rapport aux autres types d'agriculture (d'après Lorand, 1996)

Différences otologiques			
Agriculture traditionnelle <i>Elle varie en fonction des cultures, des régions, parfois des tribus. Elle est souvent un réseau des relations vivantes et dynamiques dans lesquelles :</i>	Agriculture industrielle <i>C'est une entreprise économique qui cherche un profit à court terme basé sur l'utilisation la plus efficace des ressources (naturelle, humaines, technologiques)</i>	Agriculture biologique <i>Perçoit la vie comme un écosystème complexe</i>	Agriculture biodynamique <i>C'est un système complexe vivant est dynamique (spirituel) dans lequel :</i>
La Terre est un être vivant dans l'univers vivant	La Terre est un puit de ressources illimitées	La nature sur terre est un écosystème vivant, mais purement matériel	La Terre est un être vivant dans l'univers vivant caractérisée par une matrice physico-spirituelle
Les forces travaillent dans tous ce qui est animé ou inanimé	Les substances sont utilisées de façon mécanique	Les substances sont utilisées de façon équilibrée et écologique	Les substances sont porteuses des forces (physiques et spirituelles) créatrices de vie
Les rythmes célestes jouent un rôle dans la santé et prospérité	Les technologies permettent modifier la nature	Adaptation aux conditions naturelles	Les rythmes célestes influencent directement la vie terrestre
Animaux et humain font partie du même ensemble	Animaux et humains sont vus comme des facteurs économiques	Les animaux domestiques peuvent être exclus de la ferme	Les animaux et les humains s'émancipent des rythmes célestes
La ferme n'est pas considérée comme un être à part	La ferme est une usine	La ferme est considérée comme partie intégrante de l'écosystème	La ferme est une individualité vivante, dynamique et spirituelle
Différences épistémologiques			
Traditions, rituelles, sagesse des générations, règles des tribus, superstitions	Business, règles du marché	Durabilité des actions au sein de l'écosystème	Relation de support et de soin avec l'individualité agricole. Le développement des remèdes par l'observation
Différences méthodologiques			
Pratiques culturelles ancestrales. Pas d'innovations.	Efficience des facteurs de production	Pratiques « non-explicatrices » du milieu. Innovations au sein de durabilité	Interventions préventives, thérapeutiques. Immunité des plantes et des animaux. Innovations pour les pratiques culturelles

Le concept central de l'agriculture biodynamique, selon Lorand (1996) est le concept de matrice physico-spirituelle. En plus des caractéristiques physiques, l'agriculture biodynamique comprend des éléments, des principes et des forces qui ne sont pas visibles et qu'il est difficile (voire impossible) de quantifier. Cette dimension « complémentaire » selon R. Steiner (1924), philosophe et scientifique du début du XX siècle, fondateur de l'agriculture biodynamique, a été identifiée comme spirituelle. Le but du praticien de l'agriculture biodynamique est de percevoir et d'analyser les phénomènes basés sur cette réalité étendue. Il faut noter que l'aspect physique de la réalité, sur lequel repose la science moderne n'était pas ignoré par R. Steiner.

Le praticien de l'agriculture biodynamique perçoit la ferme comme une individualité en soi. Et c'est en s'appuyant sur sa perception des forces physiques et spirituelles qui sont à l'œuvre dans cette « individualité agricole » qu'il peut entrer en relation vivante avec la ferme. En effet, le rôle de l'homme est d'être un gardien de l'équilibre de l'organisme agricole, dont il a pris la charge. En ce qui concerne les méthodes qui sont à l'œuvre dans l'agriculture biodynamique, on peut les diviser en deux groupes : les méthodes dites « biologiques » (rotations, mulching, engrais verts, pratiques de récupération de l'eau de pluie, diversification etc.), et les méthodes dites « dynamiques » (emploi des préparations biodynamiques et du compost avec des préparations biodynamiques, tisanes dynamisées, travail avec des rythmes célestes, homéopathie vétérinaire etc.) (Lorand, 1996).

Le paradigme de l'agriculture biodynamique a été confirmé par Kaltoft (1999) dans son étude des cas-types des agriculteurs danois en biodynamie et de leur attitude vis-à-vis de la nature. Ainsi, la question centrale des agriculteurs en biodynamie est d'enrichir la matière avec l'esprit (forces de vie). Dans leurs actes ils s'appuient sur les savoirs de la biologie des sols et des plantes, mais aussi sur l'observation phénoménologique du vivant. Ils perçoivent leur rôle comme étant celui d'un développeur, d'un créateur des organismes agricoles.

Ce paradigme trouve son reflet dans l'approche des vigneron en biodynamie envers les maladies des plantes. Elle consiste à poser comme hypothèse que l'agent pathogène qui provoque la maladie fait partie de l'environnement et qu'il vient se manifester en raison d'un déséquilibre préalable. Le champignon n'est pas donc perçu comme la cause de la maladie, mais comme la conséquence de ce déséquilibre plus profond (Lepetit, 2014). Afin de restaurer cet équilibre de l'environnement, le vigneron en biodynamie repose sur une vision globale de la nature. Ainsi l'utilisation des préparations à base de prêle contre le mildiou, en particulier, vient de la réflexion suivante: « La prêle est une petite plante qui pousse généralement dans des sols très humides mais qui conserve une pousse très mesurée malgré cette grande ressource en eau (...) Une observation montre donc, qu'une des qualités essentielles de la prêle est de réussir à bien gérer l'excès d'eau (...) C'est cette qualité que le vigneron cherche à transmettre à la vigne lorsqu'il pulvérise la tisane » (Lepetit, 2014).

II. Réflexions sur la mise en place du cadre de l'étude

L'agriculture biodynamique a élargi les horizons de l'agriculture conventionnelle. Par conséquent, on peut se demander si les méthodes et les techniques qui sont utilisés dans la recherche et la vulgarisation agricoles pour l'agriculture conventionnelle sont aptes à répondre aux objectifs de l'agriculture biologique et biodynamique. Les méthodes holistiques de la recherche portée sur l'agriculture biodynamique, telles que les méthodes picto-morphologiques et la science goethéenne sont considérés comme non-scientifique par la science officielle (Baars, 2002). Pendant quatre siècles, la science occidentale a été basée sur les philosophies de Descartes et de Kant dont la relation à la biologie reflète les idées de Bacon et de Newton avec une interprétation mécaniste et mathématique de

la nature. Le paradigme cartésien est communément appelé le positivisme ou le rationalisme. Selon Pretty (1995) (cité par Baars, 2002): «...la science cherche à découvrir la vraie nature de la réalité extérieure objective, le but ultime étant de découvrir, prévoir et contrôler les phénomènes naturels. Les connaissances sur le monde sont résumées sous la forme de généralisations ou de lois universelles, qui ne dépendent ni de temps, ni de contexte. La conséquence est que l'étude avec un haut degré de contrôle sur le système étudié est devenue synonyme avec la bonne science ». Et « le problème du paradigme positiviste est qu'elle exclue d'autres paradigmes possibles » Pretty (1995). Dans sa thèse, Baars (2002) compare l'approche conventionnelle de la science vis-à-vis de l'agriculture et l'approche holistique (Figure 1).

Dans l'illustration ci-dessous, dans le triangle de droite (représentation holistique de la recherche) l'action (la recherche) est guidée par des sentiments et des perceptions du sujet. En même temps, la recherche peut démarrer de n'importe quel coin du triangle. Cela n'est pas le cas pour la

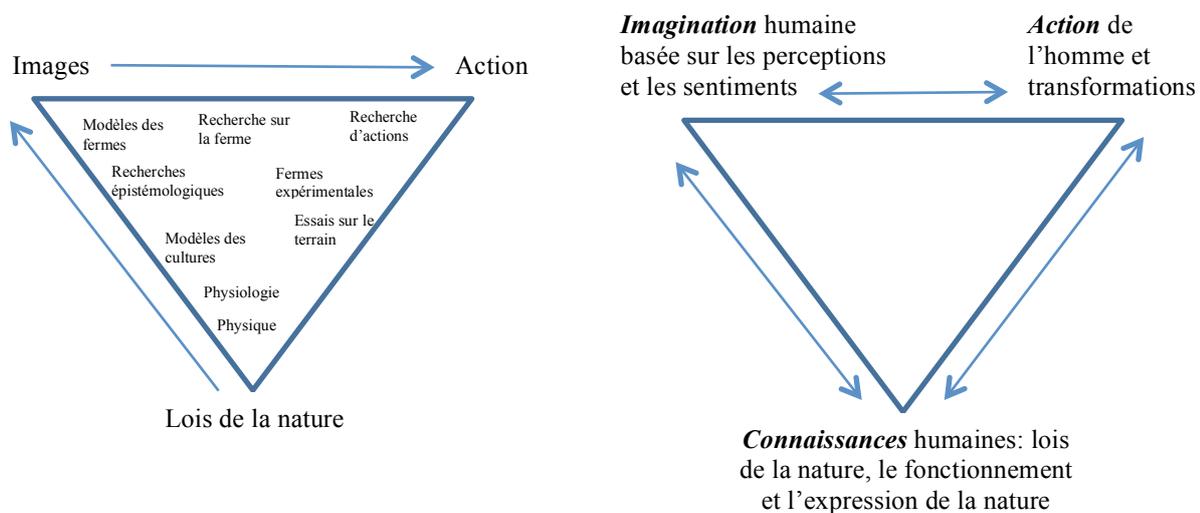


Figure 1: Une vue triangulaire de méthodes de recherche (à droite: méthode holistique, à gauche: méthode conventionnelle)

recherche conventionnelle (triangle de gauche). Par conséquent, dans notre travail nous avons choisi le cadre du triangle de droite (Figure 1) puisque nos hypothèses de départ concernent les intuitions des praticiens de la biodynamie basées sur l'observation de la nature et leur rapport vivant avec elle. Ce cadre peut être considéré comme le point de départ pour notre recherche. Néanmoins, les arguments venant de la science conventionnelle concernant le sujet étudié vont être présentés également, car l'approche holistique pour la recherche en biodynamie, comme la biodynamie elle-même, n'exclue pas de son système de réalité la réalité physique. En même temps, on verra plus tard que les phénomènes observés ne peuvent pas être expliqués par le biais des résultats de la science cartésienne seules. Les méthodes dites holistiques vont donc compléter les résultats.

Il faut noter que les résultats des recherches portant sur l'agriculture biodynamique (hors du sujet du mémoire) ne sont pas présentés dans la partie principale du travail (voir ANNEXE I), car le but de ce mémoire n'est pas de convaincre le lecteur sur l'efficacité des méthodes de l'agriculture biodynamique, mais d'apporter des éléments de réflexions et des éclairages sur certains de ses aspects. Pour cela il nous faut d'abord mettre à jour les connaissances relatives au cycle de vie de *Plasmopara viticola* et à son interaction avec la vigne. Un autre objectif est de comprendre le mode d'action des préparations à base de prêle des champs et de le resituer dans le pathosystème étudié. Il s'agira enfin d'évaluer leur efficacité à l'aide d'indicateurs choisis par la suite, tout en gardant à l'esprit que le contexte est celui de la « recherche paysanne », et que les moyens alloués à l'étude sont limités.

2^{ème} PARTIE : ETAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES

I. Le modèle d'étude vigne/*Plasmopara viticola*

1.1. Mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*)

Le mildiou de la vigne est causé par l'agent pathogène *Plasmopara viticola*, un parasite biotrophe obligatoire appartenant aux oomycètes. Le cycle biologique de *Plasmopara viticola* contient une phase de multiplication asexuelle (secondaire) pendant la période végétative de la vigne et une phase de reproduction sexuelle (primaire). Il hiverne majoritairement sous forme d'oospores dans les débris de feuilles ou de baies. Ainsi, les oospores sont la source d'inoculum primaire du pathogène. Les oospores elles-mêmes sont produites par la reproduction sexuée. Il existe peu d'information sur la température et l'humidité nécessaires pour la formation et la maturation des oospores (Jermini *et al.*, 2003). La plupart des études ont été menées sur le temps requis pour la maturation finale des oospores dans des conditions contrôlées avec pour but de prédire le temps nécessaire pour l'apparition des premières germinations dans la nature (Hill *et al.*, 1997). La reproduction sexuée se manifeste dans le mésophile des tissus foliaires (Conigliaro *et al.*, 1996, cité par Burrano, 2000) et aboutit en automne quand les températures sont inférieures à 12 °C (Burrano and Ciofalo, 1990, cité par Burrano, 2000), après la chute des feuilles, créant une accumulation de pool infectieux dans la litière. Suivant l'intensité de la maladie, le stock d'oospores peut varier entre 300 et 32 000 oospores par m² de sol (Rossi *et al.*, 2009). La durée de la période de dormance de l'oospore est déterminée par des facteurs environnementaux, en particulier par la température et l'humidité du sol.

Les oospores sont capables de germer en présence d'eau au printemps et dès que la température atteint 11 °C (Burrano and Ciofalo, 1990, cité par Burrano, 2000). Les études en Sicile ont démontré que les oospores ne germent pas avant janvier, même si les conditions optimales sont réunies (température de 20 °C et humidité relative supérieur à 95%). La germination des oospores entre janvier et mars est influencée par le stade de développement de la vigne (Burrano *et al.*, 2000). De plus l'humidité des feuilles due à l'eau atmosphérique peut être un facteur déclenchant la germination des oospores même sans périodes de pluie (Rossi and Caffi, 2007).

Les oospores peuvent contenir plus de 40 noyaux. La migration et la formation d'un sporange s'accomplit en 24 heures après le début de l'émergence du tube. La durée de vie d'un sporange varie de 6 à 10 jours (Park *et al.*, 1997). Ils sont sensibles aux conditions de température et d'humidité relative de l'air (Rossi *et al.*, 2005). Quand tous les noyaux de l'oospore ont migré dans le sporange, la division mitotique apparaît en son sein. Ainsi, un sporange mature relâche des zoospores biflagellés (en général unicellulaires) qui sont une source de contamination primaire du pathogène.

Une fois que les zoospores ont atteint une feuille (par le biais des gouttes d'eau), elles secrètent une matrice extracellulaire glycoprotéique pour s'attacher à la surface de la plante (Grenville-Briggs and Van West, 2005). Ensuite elles germent afin de former un tube germinatif qui pénètre dans les stomates. Une vésicule sous-stomatique se développe et forme le mycélium intercellulaire avec un grand nombre d'haustoria qui pénètrent les parois cellulaires du mésophile. Les veines des feuilles retiennent le mycélium empêchant ainsi une propagation des hyphes. Tous les tissus herbacés de la vigne, les feuilles, les vrilles ou les bourgeons, ainsi que les grappes peuvent être sensibles à la *Plasmopara viticola*.

Entre 4 et 5 jours après l'infection de la feuille, les « tâches d'huile » apparaissent sur la feuille. Si la feuille est soumise à une humidité élevée, les hyphes pénètrent dans les cavités sous-stomatiques, et les sporangiophores émergent des stomates (Burrano, 2000). Les sporangiophores de la *Plasmopara viticola* forment des branches qui se ramifient et portent des sporanges. Ces derniers libèrent les zoospores biflagellées qui seront responsables de la propagation de la maladie lors des infections

secondaires (phase asexuée du pathogène). Rossi et Caffi (2012) concluent que les pluies d'intensité de 0.2 mm/h suffisent à disperser des zoospores. Les conditions appropriées pour la sporulation sont : l'humidité saturée et une température autour de 18°C.

La phase sexuelle a été considérée pendant longtemps comme la seule responsable de l'initiation de la maladie au printemps. La phase asexuelle a été considérée plutôt comme une phase de multiplication et une responsable de la dispersion de la maladie dans le temps et dans l'espace. Les études récentes sur les populations génétiques du mildiou de la vigne (Gobbin *et al.*, 2006; Pertot *et al.*, 2003) ont démontré que contrairement à ce qui a été pensé, les infections dues aux oospores ne sont pas seulement importantes pour l'initiation de la maladie mais aussi pour sa propagation.

Néanmoins, Gobbin *et al.* (2005) ont démontré que les infections secondaires dans la plupart des cas sont localisées spatialement (sur une feuille, une branche ou le niveau de la vigne). La migration pendant le cycle asexué n'atteint jamais plus de 20 m. En général, la migration des clones issus de la reproduction asexuée suit un modèle de migration par étapes (Gobbin *et al.*, 2005). De plus, la plupart des génotypes ont une capacité limitée de se reproduire asexuellement (Gobbin *et al.*, 2004).

1.2. Les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes

Le système de défense des plantes est construit en deux niveaux. Le premier est constitué d'une barrière physico-chimique, incluant la cuticule, les parois, les enzymes antimicrobiennes et des métabolites secondaires (Nurnberger *et al.*, 2004). Les microorganismes qui parviennent à franchir cette première ligne de défense seront confrontés à d'autres mécanismes de défense induits après leur perception par l'hôte (Gamm, 2011). Cette perception est possible grâce à la reconnaissance de signaux externes appartenant aux microorganismes ou aux pathogènes (microbe/pathogen associated molecular patterns MAMPs/ PAMPs) par des récepteurs (pattern recognition receptors (PRRs) présents à la surface des cellules. Ces récepteurs reconnaissent des protéines, glycoprotéines, lipides ou glucanes spécifiques aux microorganismes (Burketová *et al.* 2015). Ces molécules sont appelés « éliciteurs ». La perception des éliciteurs par la plante induit une cascade de mécanismes de défenses basales (MAMP/PAMP/pattern-triggered immunity (MTI/PTI)). Cela implique des changements du potentiel membranaire, un efflux d'anions, des changements de concentrations en calcium libre cytosolique et nucléaire et l'induction de la production de formes actives d'oxygène et de monoxyde d'azote (Gamm, 2011 ; Burketová *et al.* 2015). Les éliciteurs peuvent avoir une origine exogène ou endogène.

Dans un second temps, les gènes de défense de la plante sont activés. L'activation des gènes de défense entraîne une accumulation de différents enzymes et des métabolites liés au stress et ils représentent également des molécules d'intérêt pour lutter contre les bioagresseurs des plantes (Burketová *et al.* 2015). Ces réponses immunitaires dépendent de phytohormones tels que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène (ET) et l'acide abscissique (AB) (Glazebrook, 2005), mais aussi des auxines, des brassinostéroïdes (BR) ou des gibbérellines (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011) et de la communication entre eux.

Les agents pathogènes au cours de leur évolution ont développé des stratégies leur permettant de contourner ces réactions de défense. Ils sécrètent et transmettent des effecteurs (molécules, toxines ou protéines) spécifiques lors de l'infection afin de perturber le système immunitaire de l'hôte et gagner plus de nutriments. Chez les oomycètes, il peut y avoir une sécrétion d'inhibiteurs de glucanases ou protéases végétales qui agissent dans l'appoplasme de l'hôte (Kamoun, 2006).

Les plantes ont à leur tour développé un mécanisme de résistance basé sur la perception des effecteurs : le mécanisme de l'immunité induite par un effecteur (effector-triggered immunity, ETI). Les événements impliqués dans l'immunité induite par des effecteurs incluent l'induction de l'expression

des gènes PR, des renforcements pariétaux et une production de phytoalexines (Dodds et Rathjen, 2010). Ces réponses impliquent également la synthèse d'hormones.

Une infection de la plante par un pathogène déclenche également la résistance systémique acquise (SAR). La mise en place de la SAR nécessite le mouvement systémique d'un signal à partir des tissus infectés vers les tissus sains. Des molécules comme l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène (ET), la systémine et même le peroxyde d'hydrogène participent à ces différentes voies de signalisation mises en œuvre en réponse à une élicitation. Ces molécules s'accumulent rapidement dans la cellule et permettent l'activation de l'expression des gènes de défense. Leur application de façon exogène peut aussi déclencher les mécanismes de la SAR.

Les stratégies de stimulation des défenses des plantes revêtent un intérêt particulier en tant qu'alternative aux traitements chimiques.

1.3. Les réactions de défense de la vigne contre le mildiou

L'agent pathogène responsable du mildiou induit des altérations physiologiques, telles qu'une dérégulation d'ouverture des stomates, qui restent ouverts la nuit (Allègre, 2007). De plus, la *Plasmopara viticola* induit des modifications du métabolisme primaire comme une diminution de la photosynthèse et une accumulation anormale de l'amidon dans les zones infectées (Gamm, 2011).

Une des réactions de défense la mieux décrite chez la vigne face à l'attaque du mildiou est la production des phytoalexines et leur accumulation au niveau des stomates (Dai *et al.*, 1995 ; Jeandet *et al.* 2002) qui ont un effet sur les zoospores de l'agent pathogène (Pezet *et al.*, 2004). Le dépôt de callose au niveau des stomates pourrait également perturber l'enkystement des zoospores (Gindro *et al.*, 2003). De plus, lors de la perception de *Plasmopara viticola* par la vigne, une protéine impliquée dans la signalisation de la voie de l'acide salicylique, à son tour impliqué dans l'activation de défense naturelle a également été identifiée (Le Henanff *et al.*, 2009).

II. La prêle des champs (*Equisetum arvense*) et ses effets potentiels contre le mildiou de la vigne

2.1. Les vertus de la prêle des champs (*Equisetum arvense*)

L'*Equisetum arvense* L. (la prêle des champs), appartenant à la famille d'*Equisetaceae*, est une plante qui pousse dans plusieurs régions d'Europe et d'Amérique du Nord, Centrale et du Sud. Des études ont montré qu'elle possède des constituants antioxydants (acide caféique, l'acide chlorogénique, acide férulique, kaempférol, quercétine, isoquercetin, apigénine, lutéoline) (Garcia *et al.*, 2012). En outre, la prêle des champs est riche en de nombreux types de vitamines, telles que B1, B2, B6, en acide nicotinique, en acide folique, en acide pantothénique, en vitamines C, E, K, en acide silicique, en saponines, et en oligo-éléments tels que Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn, Si, Sr, et Ti (Nagai *et al.*, 2005, Laboun, 2013).

Il existe peu d'études qui décrivent une activité antifongique des extraits d'*Equisetum arvense* (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2009; Milanovic *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2005). Néanmoins, Garcia *et al.* (2012) ont constaté qu'une utilisation de l'extrait d'*Equisetum arvense* (de concentration de 3%) a été efficace pour atteindre 100% d'inhibition de croissance de l'*Aspergillus carbonarius* et de *Fusarium verticillioides*. Cet effet antimicrobien de la prêle des champs pourrait être attribué à la présence de phénols dans son extrait (Pattnaik *et al.*, 1997; Radulovic *et al.*, 2006). Les profils chromatographiques (HPLC-DADDEDL) montrent que les polyphénols constituent 5% de la masse sèche de l'extrait de prêle (Marchand *et al.*, 2014). La même étude montre l'absence d'effet « éliciteur » de la préparation à base de prêle sur les salades, tandis que l'effet antigéminatif de la prêle contre les souches testées

(*Botrytis allii*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*) a été démontré. En outre, Gindro et *et al.* (2007) ont testé la capacité de la décoction de prêle à « éliciter » les mécanismes de défense de la vigne (en utilisant comme marqueurs la synthèse de phytoalexines stilbéniques et la production de callose dans les stomates). Il a été conclu que la décoction de prêle n'a pas d'effet « éliciteur », mais un effet fongitoxique (notamment antigerminatif) direct sur le mildiou avec une efficacité de 71%. En ce qui concerne l'emploi des préparations biodynamiques à base de prêle des champs, c'est seulement dans des rapports des organisations professionnelles qu'on a pu trouver des résultats qui méritent de l'attention. Dans ces rapports, on relève que la prêle des champs couplée à du cuivre à 100g/ha a été aussi efficace que le cuivre seul à 600g/ha contre le mildiou de la vigne (Chovelon et Baron, 2011). Néanmoins, ils ne précisent pas la façon précise dont ils ont préparé la décoction de prêle.

Par conséquent, la vertu principale de la prêle des champs face aux agents pathogènes est attribuée à sa richesse en polyphénols. Néanmoins, la question qu'on peut se poser est la suivante : y a-t-il un rôle de l'acide silicique dans l'efficacité importante des préparations à base de prêle des champs contre les agents pathogènes et le mildiou en particulier ?

2.2. L'acide silicique et les maladies des plantes

Le silicium est l'un des éléments les plus abondants dans la lithosphère (28% de la croûte terrestre). Bien qu'il ne soit pas considéré comme un nutriment essentiel pour la plupart des plantes, beaucoup de preuves montrent les effets bénéfiques de nutrition avec *Si* sur la croissance, le développement et la santé des plantes (Romero *et al.*, 2011). Ces effets favorables comprennent l'augmentation de la croissance et de la production, l'amélioration de certaines caractéristiques morphologiques (hauteur, pénétration des racines dans le sol, exposition des feuilles à la lumière, résistance à la verse), la transpiration réduite (réduction de la perte d'eau par transpiration cuticulaire causée par la formation de dépôts de *Si* sous la cuticule) et la résistance au stress, mais aussi la résistance à la salinité et la toxicité des métaux toxiques et la résistance accrue aux agents pathogènes (Romero *et al.*, 2011).

Il a été proposé que dans une cellule, le *Si* contrôle les événements de signalisation qui guident la synthèse de ses composés antimicrobiens, mais pourrait aussi contrôler la génération des signaux systémiques. Ainsi, l'acide silicique pourrait jouer un rôle d'inducteur de la résistance locale et systémique (Fauteux *et al.*, 2005). Cependant, le mécanisme exact de l'action de *Si* dans la signalisation n'est pas encore clair. Le tableau suivant donne quelques références qui ont mis en évidence une diminution de l'incidence de certaines maladies fongiques grâce à l'application de silicium, ainsi que son mode d'action (Tableau 2).

Tableau 2: Résultats de certaines recherches portant sur l'effet du *Si* sur des maladies fongiques (d'après Romero *et al.*, 2011)

Patho-système	Résultats/description du mode l'action	Auteurs
Riz- <i>Magnaporthe grisea</i>	La densité de cellules silicifiées augmente dans l'épiderme des feuilles. Ces cellules agissent comme une barrière physique pour empêcher la pénétration du champignon.	Yoshida <i>et al.</i> , 1962b Datnoff <i>et al.</i> , 1991;
	<i>Si</i> peut former des complexes avec des composés organiques dans les parois cellulaires des cellules de l'épiderme, ce qui peut augmenter la résistance face aux enzymes libérées par le pathogène.	Volk <i>et al.</i> , 1958, Inanaga <i>et al.</i> , 1995
	La colonisation fongique a été significativement réduite dans des échantillons de plantes fertilisées avec <i>Si</i> et les quantités de phtaléines sont plus élevées.	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004

	Augmentation de la production de radicaux d'O ₂ - sur les feuilles de riz traitées avec le Si ; cela empêche la croissance du champignon.	Datnofft <i>et al.</i> , 2007
Concombre- <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Corrélation négative entre les concentrations en Si dans les tissus foliaires de plants et la surface foliaire couverte par les colonies de <i>S. fuliginea</i> ; l'accumulation de Si autour des colonies affecte les colonies de champignon.	Menzies <i>et al.</i> , 1991a
	Accumulation rapide des composés phénoliques dans un grand nombre de cellules des échantillons amendées avec Si et inoculées avec <i>S. fuliginea</i> .	Menzies <i>et al.</i> , 1991b
Concombre- <i>Pythium ultimum</i>	Augmentation de la densité d'électrons causée par la présence de composés phénoliques et de l'activité antifongique, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la chitinase, des peroxydases et de la polyphénoloxydase dans les tissus des plants.	Chérif <i>et al.</i> , 1992
	Si pourrait agir comme un potentialisateur des réactions de défense ou comme activateur de la signalisation cellulaire médiée par des protéines.	Fauteux <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Erysiphe cichoracearum</i>	<i>A. thaliana</i> a la capacité d'absorber le Si soluble qui la protège contre l'infection par l' <i>E. cichoracearum</i> ; une fois absorbé par la plante, Si fonctionne comme un médiateur de réactions de défense et peut contrôler l'activité des systèmes de signalisation cellulaires.	Ghanmi <i>et al.</i> , 2004

Comme cela a été montré, Si est connu pour être impliqué dans la voie de la SAR. Son application extérieure sous différentes formes (dont l'acide silicique) peut également activer cette voie de résistance chez les plantes (Ryals *et al.*, 1996). Selon Chovelon et Bardon (2011) la prêle des champs posséderait des propriétés antifongiques et renforcerait les défenses naturelles des autres végétaux grâce à sa forte teneur en silicium, de 5 à 10 % de la matière sèche selon les espèces.

Pour conclure, les effets de la prêle des champs sont à la fois connus et méconnus. De fait, les végétaux supérieurs possèdent une multitude de composés actifs et il est difficile de conclure sur l'exclusivité de l'action de l'un d'entre eux face à l'agent pathogène ou face à la plante. Il est probable que la prêle des champs soit capable d'agir dans les deux niveaux en même temps : sur l'agent pathogène directement, mais aussi sur la plante elle-même en activant ses mécanismes de défenses naturelles.

III. Vigueur de la vigne et sa sensibilité aux attaques du *Plasmopara viticola*

La compréhension du lien entre le comportement végétatif, la vigueur de la vigne et sa sensibilité aux agents pathogènes et au mildiou en particulier est d'importance aujourd'hui (Valdes *et al.*, 2005). Les travaux scientifiques montrent que la surface foliaire et la densité du couvert renseignent sur l'environnement micro-climatique de la vigne (hygrométrie et humectation des feuilles notamment) qui sera favorable au développement du mildiou en particulier (Valdes *et al.*, 2005). Un degré élevé d'ombrage dans un couvert peut également diminuer la fécondité des bourgeons, retarder la croissance des baies et leur maturation et diminuer le développement du couleur des fruits. Ainsi, la mesure de la surface foliaire constitue un bon moyen pour évaluer la vigueur de la vigne (Smart *et al.*, 1990 ; Tregoat *et al.*, 2001). Elle peut être également utilisée pour estimer la photosynthèse de la vigne (Hunter, 1998) ou encore la pénétration solaire potentielle dans la vigne (Smart, 1988). Cependant il est important de distinguer la surface foliaire des rameaux primaires (issus des bourgeons dormants) et

la surface des foliaires des rameaux secondaires (issus de prompts bourgeons). Ces derniers peuvent contribuer à une vigueur excessive de la vigne ce qui peut entraîner un entassement de la végétation, qui à son tour aurait une influence sur le microclimat des grappes (Smart et Robinson, 1991, cité par Tregouat *et al.* 2001, Zufferey, 2000).

De plus, un indice de statut azoté de la vigne mesuré à partir des feuilles pourrait être un bon indicateur de la vigueur de la vigne (Valdes *et al.*, 2005), car l'azote est indispensable pour la croissance des végétaux. En même temps, les organes riches en eau, en azote et en sucres sont très sensibles aux attaques du mildiou. Les feuilles des vignes vigoureuses développent plus de photosynthèse ce qui pourrait alors attirer le parasite.

La méthode biodynamique montre des effets sur la croissance de la vigne. En ce qui concerne la structure de la vigne dans les modalités biodynamiques par rapport aux biologiques, une structure plus aérée du feuillage et des grappes avec des baies plus petites et un moindre degré de compacité ont été observés (Meißner G., 2013). Néanmoins, l'effet de l'application des produits à base de prêle des champs en viticulture conventionnelle ou biodynamique sur la vigueur de la vigne n'a pas été étudié.

Cependant, la sensibilité de la vigne aux attaques fongiques est souvent associée non seulement aux conditions climatiques mais aussi aux facteurs dits secondaires comme les pratiques agro-viticoles (Bavaresco et Eibach, 1987). Par conséquent, il est important d'étudier l'effet des préparations biodynamiques à base de prêle des champs non seulement sur le pathogène lui-même mais aussi sur la vigueur de la vigne afin de mieux comprendre leurs modes d'action dans le pathosystème vigne-*Plasmopara viticola*.

IV. Une approche holistique pour caractériser l'état intrinsèque de la vigne

Les méthodes globales d'analyse de la qualité d'une substance ont été principalement développées dans les milieux de l'agriculture biologique et biodynamique (Taupier-Létage, 2009) car leurs paradigmes incluent des concepts tels que « vitalité », « les forces de vie » d'une substance et que les méthodes analytiques classiques ne permettent pas d'avoir cette approche globale du vivant, d'autant plus que la science moderne est sceptique quant à la réalité de ces concepts. Parmi les méthodes dites holistiques, on peut citer la Bioélectronique de Vincent (BEV), la cristallisation sensible, la Biophotonique et le Bioscope, la méthode des gouttes sensibles et la Morpho-Chromatographie.

La méthode de Morpho-Chromatographie est une méthode dite sensible ou encore holistique et qui contrairement aux méthodes analytiques qui séparent les substances, tente d'analyser une substance organique (extrait de plante dans notre cas) dans son intégrité. Sa vocation est de caractériser un état intrinsèque global du produit. Cette méthode a été développée par L. Kolisko et H. Pfeiffer selon des indications de R. Steiner. Elle consiste à faire migrer radialement une solution de substance organique, qui auparavant a subi une digestion alcaline, sur un papier filtre et dans laquelle une solution minérale de nitrate d'argent a été imprégnée. Une lecture de l'image ainsi formée permet de caractériser la qualité de la substance organique (Pfeiffer, 1984).

En ce qui concerne la « vitalité », Pfeiffer disait que, si l'on prenait une graine et qu'on l'analysait pour décrire ces composants chimiques (protéines, hydrates de carbone, lipides, minéraux, vitamines) on ne serait pas capable de conclure sur la capacité de cette graine à germer. Et pourtant

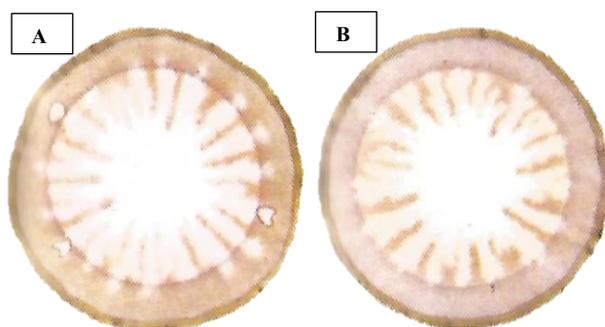


Figure 2: Chromatogrammes réalisées par Pfeiffer (1984) A: graine de blé (94% de germination); B: graine de blé exposée à la température, absence de germination

une graine capable de germer est différente de celle qui ne l'est pas. Pour montrer cette différence Pfeiffer a utilisé la méthode de Chromatographie circulaire, car auparavant il a déjà pu mettre en évidence la différence entre un sol « vivant » (biologiquement actif) et un sol « mort » (pas d'activité biologique), entre les vitamines synthétiques et naturelles etc. Ainsi, le chromatogramme formé à partir d'une substance organique nous permet de « lire » cette substance. Ci-contre, des chromatogrammes réalisés à partir d'un même type de graine de blé (Figure 2) avec initialement un taux de germination de 94% pour les deux échantillons. La seule différence entre les échantillons A et B est que l'échantillon B a été d'abord soumis à la température élevée (212 °F pendant 30 min) avant le test.

Pfeiffer (1984) a proposé une lecture de ces images. Mais une description des termes utilisés pour cette lecture est d'abord nécessaire. Selon Pfeiffer (1984), il faut observer d'abord le nombre, la largeur et la couleur de différentes zones ainsi que leurs formes (régulières ou irrégulières) et les ombrages. On peut distinguer trois zones principales : une zone extérieure, une zone centrale (qui correspondent à la nature de la substance testée) et une zone intérieure, qui indique (dans le cas des sols) la présence ou l'absence de la minéralisation. La largeur de ces zones correspond à la quantité des substances caractéristiques. Ensuite on regarde les formations d'anneaux entre la zone centrale et la zone extérieure et au bord de la zone extérieure. Les couleurs des zones sont d'importance également. Et enfin, on observe les radiations, le nombre, la couleur et la forme des ramifications (des aiguilles ou dents). Gelin (1994) (cité par Rust, 1996) a donné des indications concernant de différentes zones d'un chromatogramme (Figure 3). Ainsi, en ce qui concerne la Figure 2, selon Pfeiffer (1984), les anneaux circulaires extérieurs présents sur les deux images correspondent à de l'amidon. Les aiguilles qui percent la zone centrale à partir de la zone extérieure correspondent aux protéines ; elles indiquent leur quantité et leur qualité. Pfeiffer considère que ces formations en forme d'aiguilles sont une expression de la vie, car les substances mortes ne possèdent pas de telles structures sur l'image formée. Une teinte rosâtre correspond à la thiamine, comme cela a été montré par les chromatogrammes à partir de la thiamine pure auparavant. Une caractéristique très importante de l'image A (graine capable de germer) est la présence de formations circulaires à l'extrémité des aiguilles. Cela se relève seulement sur des images d'une substance vivante. La zone transparente ou blanchâtre entre l'anneau périphérique et l'anneau central reflète également la présence de vie (Pfeiffer, 1984). L'illustration B correspond à l'image formée à partir de la graine qui a été soumise à la température de 212 °F pendant 30 min. Par conséquent, cette graine a perdu sa capacité de germination. Pourtant, les analyses chimiques dans les deux cas (A et B) montrent la même quantité de protéines, d'hydrates de carbone, de lipides, de vitamines et de minéraux. Seule l'humidité a été réduite (de 12,8% à 10,9%). La graine B a perdu certaines enzymes (sensibles à la température), mais aussi la vie. La structure des acides aminés a été légèrement changée également. Les mêmes composés chimiques sont retrouvés sur les deux images, cependant on ne trouve plus de « signes de vie » sur la seconde (anneaux circulaires quasi transparent et les formations circulaires transparentes au bout des aiguilles). Par conséquent cette approche sera utilisée lors de l'étude de la vigueur de la vigne et sa sensibilité au mildiou. Il est important de noter, qu'elle ne prétend pas à elle seule apporter la vérité, mais qu'elle sera plutôt employée comme une méthode complémentaire aux analyses classiques qui seront effectuées par la suite.

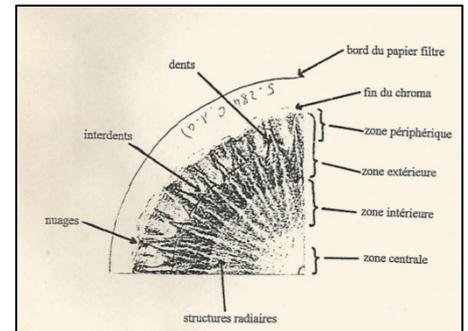


Figure 3: Description des notions utilisées lors de la lecture d'un chromatogramme

3^{ème} PARTIE : MATERIELS ET METHODES

L'étude s'est déroulée en deux étapes. La première étape expérimentale a été effectuée dans les conditions contrôlées. La deuxième étape a été réalisée sur deux domaines viticoles. Tous les traitements et mesures ont été réalisés par nos soins.

I. Germination des oospores du mildiou dans des conditions contrôlées

1.1. Problématique

Il existe deux composantes pour déterminer le taux de la transmission du pathogène *Plasmopara viticola* : la dispersion (le nombre et la taille des sporanges) et l'infection (le nombre et la taille des zoospores) (Lannou, 2012 ; Delmas *et al.* 2014).

Dans notre cas, nous étudions la **capacité de dispersion du pathogène**. Le but de cette étude est d'évaluer la production des sporanges en fonction du temps, en sachant d'avance que la variabilité du temps de formation des oospores et des conditions microclimatiques pendant l'hiver, ou encore la taille des sporanges ne sont pas pris en compte. Ce suivi biologique permet de connaître l'effet des préparations à base d'*Equisetum arvense* sur la maturité et la germination des œufs d'hiver de mildiou.

L'**hypothèse de travail** est l'affirmation que les préparations à base de prêle des champs (*Equisetum arvense*) retardent la germination des oospores du mildiou et/ou ont un effet antigéminatif sur celles-ci, diminuant ainsi la dispersion du pathogène.

1.2. Caractéristiques pédoclimatiques du site d'essai

L'expérimentation a eu lieu dans un pré-verger, situé dans le lieu-dit Les Crêts, dans le village de Château (71250), au Sud du département de la Saône-et-Loire. Ce verger est situé sur un coteau exposé Est/Sud-Est. Il s'agit d'un terrain appartenant à Pierre Masson, cultivé en biodynamie depuis 20 ans. La région est sous l'effet d'un climat semi-continental avec une température moyenne proche de 12°C, avec une pluviométrie annuelle de 900 mm. Les sols sont essentiellement des sols bruns calcaires. Les vents dominants sont orientés Sud-Ouest Nord-Ouest.

1.3. Préparation des échantillons et hivernage

Les feuilles possédant des sporulations de mildiou ont été collectées dans une parcelle de vigne début novembre sur le cépage Chardonnay. Début mars, les zones colonisées ont été détectées sous une loupe binoculaire. Sur ces zones des fragments des feuilles d'environ 50 mm² ont été découpés et ont été placés ensuite dans des capsules recouvertes d'un grillage permettant les échanges avec l'environnement mais empêchant le dommage des fragments par la faune du sol. Chaque capsule contenait 12 fragments. Chaque modalité possédait deux capsules dédiées. Les échantillons ont ensuite été placés dans des tubes à mildiou remplis de terre modérément tassée jusqu'à 2-3 cm de son extrémité et couverts par une couche de 1-2 cm du sable, puis d'un grillage (Figure 4). Ce tube est ensuite placé verticalement dans le sol, de manière à ce que son extrémité supérieure se trouve au ras du sol.

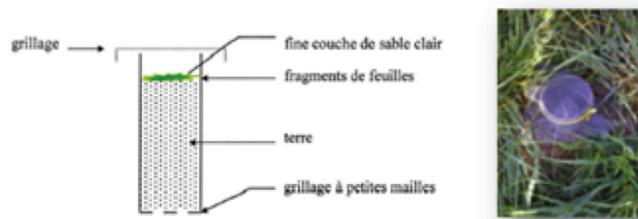


Figure 4: Tube à mildiou (dimensions du tube 30 à 50 cm de longueur et 5 à 10 cm de diamètre environ)

1.4. Incubation des oospores

A partir du 20 avril, chaque semaine, deux fragments de feuilles par capsule (quatre par modalité) ont été amenés dans le laboratoire. Les fragments des feuilles ont été placés dans des boîtes de Petri sur des papiers filtre et sur une couche de coton imprégnée d'eau distillée et gardés dans une température de 18-20 °C pour déclencher la germination des oospores.

1.5. Dispositif expérimental et modalités de l'essai

Trois préparations à la base de prêle des champs (*Equisetum arvense*) ont été testées : DEA (décoction d'*Equisetum arvense* simple), qui est utilisée le plus souvent par les agriculteurs en biodynamie, DEAF (décoction d'*Equisetum arvense* fermentée), préparée selon des indications du laboratoire WALA en Allemagne, D5 (dilution au 1 : 10⁵ de la décoction fermentée). Les résultats ont été comparés au témoin non traité. Toutes les préparations avant la pulvérisation sont diluées dans l'eau à raison de 1:10 et ensuite brassées pendant 20 min (3 min dans le cas de D5). La dose de produit final employé était de 115 l/ha (dont 10% de préparation de base et 90% d'eau). Chaque préparation a été pulvérisée sur une surface de 20 m², autour d'un spot correspondant, à l'aide d'un pulvérisateur manuel. Deux traitements ont été effectués : une semaine avant Pâques (le 28/03/2015) et une semaine après Pâques (le 13/03/2015). Chaque traitement a été appliqué au hasard à deux spots, chacun contenant une capsule avec 12 fragments des feuilles.

Quatre fragments de feuilles provenant de deux capsules d'une modalité ont été prélevés chaque semaine (quatre prélèvements au total). Ensuite chaque fragment a été visuellement divisé en mini-fragments de 2 mm² afin d'homogénéiser la base de comparaison des variables étudiées. Chaque date de mise en culture des fragments des feuilles a été considérée comme un bloc dans le dispositif expérimental et les quatre feuilles ainsi prélevées comme une unité expérimentale.

Les variables étudiées sont **le temps de première germination des oospores observé et le nombre total de sporanges produits par dix fragments des feuilles de 2 mm²**. Ainsi, l'essai a été mis en place selon un dispositif expérimental en blocs aléatoires complets équilibrés.

1.6. Mesures et traitements de données

Une notation visuelle, qualitative de la germination des oospores du mildiou a été effectuée pendant quatre semaines à partir du 20 avril. Les sporanges ont été comptés et ensuite détruits à l'aide d'une aiguille.

La maturité des œufs est considérée comme acquise lorsque la germination des spores contenues dans les échantillons s'effectue en moins de 24 h (protocole FREDON). Les sporanges sont notés sur chaque modalité par le même notateur à une fréquence journalière. L'observation de chaque échantillon durait une semaine.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel R et de Microsoft Excel.

II. Essai en plein champ

2.1. Problématique

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet des préparations à base de prêle des champs (*Equisetum arvense*) sur la vigueur de la vigne ainsi que leur efficacité contre le mildiou de la vigne sur des parcelles sensibles à l'agent pathogène du mildiou *Plasmopara viticola* et conduites en agriculture biodynamique.

La première hypothèse de travail est l'affirmation que les préparations à base de prêle des champs (*Equisetum arvense*) diminuent l'intensité et la fréquence d'attaque du mildiou de la vigne. **La deuxième hypothèse** concernant la vigueur de la vigne est l'affirmation que les préparations

testées ont un effet sur la vigueur de la vigne et ainsi indirectement sur sa sensibilité au mildiou. Cet effet doit être décrit pour pouvoir poser des hypothèses plus précises concernant la vigueur de la vigne pour des essais à venir.

2.2. Caractéristiques pédoclimatiques des sites de l'essai

L'étude a été menée sur trois sites différents sur deux cépages : Chardonnay (Domaine de Céline et Laurent Tripoz, Domaine La Soufrandière de chez Bret Brothers) et Pinot Noir (Domaine de Céline et Laurent Tripoz).

Le Domaine Tripoz est situé sur la commune de Loché dans le Mâconnais. La vigne (Chardonnay et Pinot Noir) a été plantée en 2000 sur un terrain où les propriétaires précédents plantaient du maïs. Dès 2001 les parcelles ont été conduites en agriculture biodynamique. Le porte-greffe utilisé est *V. riparia*. Il faut noter que les vignes américaines sont utilisées comme porte-greffe dans 85% du vignoble mondial grâce à leur résistance à de nombreuses maladies. La vigne de Pinot Noir est conduite en guyot simple, quant au Chardonnay, elle est conduite en arcure. Dans les deux cas les vignes sont implantées avec une densité de 8000 pieds/ha (1,1 x 0,95 m). La surface totale de la parcelle en Pinot Noir est de 20 ares et celle du Chardonnay est de 33 ares (dont environ 3 ares sont dédiées à l'essai pour chacun de cépages). Sur l'aspect géologique, le sol est profond argilo-limoneux avec une roche très calcaire. Les parcelles sont orientées Est-Ouest avec une légère pente de 4%. Les parcelles sont labourées sur toute la surface.

Le Domaine La Soufrandière quant à elle est située sur la commune de Vinzelles (A.O.C. Pouilly-Vinzelles). Les vignes âgées de 25 à 70 ans sont situées sur un coteau argilo-calcaire avec une exposition Sud-Est. Depuis 2001, le domaine pratique la biodynamie sur l'ensemble des parcelles. Le seul cépage cultivé est le Chardonnay. Les vignes sont implantées avec une densité de 8000 pieds/ha. Les parcelles sont labourées et la surface dédiée à l'essai est de 3 ares.

2.3. Déroulement de l'expérimentation

Les traitements sur l'essai en plein champ ont été effectués de manière hebdomadaire à partir du 28 mars et jusqu'au 29 juin à l'aide d'un pulvérisateur manuel. Les doses appliquées sont de 115 L/ha (dont 10% de la préparation testée et 90% de l'eau) pour chaque modalité étudiée.

2.4. Dispositif expérimental et modalités de l'essai pour l'évolution de l'effet des préparations sur le mildiou de la vigne

L'essai a été mené en plein champ et sans inoculation artificielle de l'agent pathogène. L'utilisation du protocole CEB °007 est recommandée pour étudier les propriétés d'une préparation afin de pouvoir comparer des résultats obtenus avec ceux provenant d'expérimentations menées ailleurs. Dans notre cas nous avons suivi des indications de la norme **OEPP PP 1/31(3)** (*Évaluation biologique des fongicides. Plasmopara viticola*).

Les modalités de l'étude sont :

- Produits à étudier (4 modalités mentionnés pour l'étude de la germination des œufs d'hiver plus une modalité LD (produit commercial à la base d'igname et d'*Equisetum arvense*) ;
- Produit de référence (traitement au cuivre) (pour les notations du mildiou seulement) ;
- Témoin non traité (traité à l'eau).

Le témoin non-traité permet d'observer et de suivre le mildiou. Un produit de référence permet de comparer les effets des traitements étudiés par rapport à la pratique habituelle. Les notations sur la modalité recevant les traitements cupriques habituels sont effectués sur les parties des parcelles étudiées, qui n'étaient pas dédiées à l'essai.

Les trois parcelles étudiées sont considérées (Pinot Noir T, Chardonnay T et Chardonnay B) comme blocs dans le dispositif expérimental. Chaque modalité est répétée deux fois au sein de chaque bloc. Ainsi l'unité expérimentale est une parcelle élémentaire d'une modalité de 26 m² au sein de chaque bloc. Elle est constituée d'un rang de 8-12 vignes.

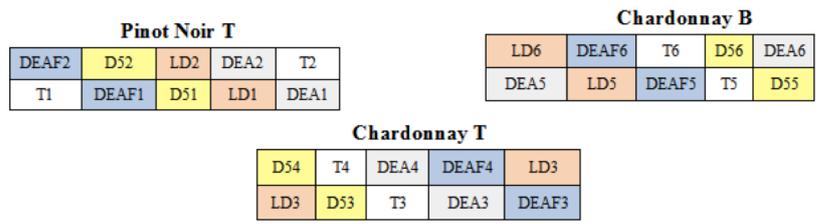


Figure 5: Une représentation schématique du dispositif expérimental du départ

L'essai pourrait être disposé en bloc complet chacun contenant deux répétitions. Cependant, ce modèle ne peut pas être utilisé dans notre situation, car, premièrement, la disposition des modalités de traitements entre les blocs est aléatoire, mais au sein des blocs elle ne l'est pas pour des raisons de facilitation de passage lors de l'essai. Plus précisément, l'attribution des traitements aux unités expérimentales au sein d'un bloc A (Pinot Noir T) pour la répétition X d'une modalité donnée a été effectuée de façon aléatoire, par contre l'emplacement de la répétition X+1 de la même modalité a été conditionné par celui de la répétition X (Figure 5). Deuxièmement, l'effet de bloc de l'unité expérimentale (plot) mais aussi des types des traitements, ainsi que leur interaction devraient être vérifiés, mais le manque de répétitions pour chaque facteur mentionné ci-dessus ne le permet pas. Ainsi le dispositif expérimental décrit ci-dessus a été transformé en dispositif expérimental en blocs aléatoires complets équilibrés avec sous-échantillonnage (Figure 6).

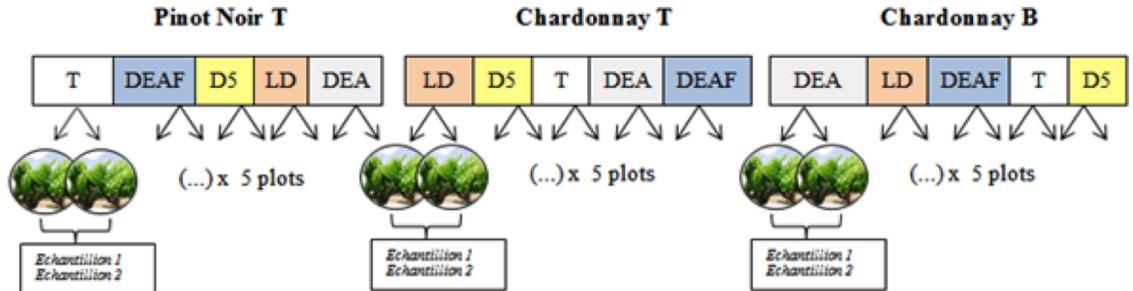


Figure 6: Une représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour les analyses statistiques de données

La nouvelle unité expérimentale correspond donc à deux micro-parcelles de 26 m² désignées initialement au sein de chaque bloc. Un échantillon dans ce cas serait un ensemble des vignes centrales de chaque micro-parcelle de 26 m². Les unités expérimentales sont séparées par un rang de garde. Ce rang n'est pas compté et reçoit deux modalités de traitements de chaque côté (afin de protéger la vigne et la récolte pour les vigneron en cas d'attaque violente du mildiou). Le traitement avec du cuivre sur l'ensemble des parcelles dédiées à l'essai peut être envisagé lorsque une attaque du mildiou est importante.

2.5. Mesures et traitements des données : notation du mildiou de la vigne

Les évaluations en plein champ sont faites à partir de l'apparition des premiers symptômes de la maladie avec des intervalles de sept jours (à la date d'aujourd'hui, le 21 août, aucun symptôme n'est apparu). Des feuilles de vigne et des grappes sont évaluées visuellement. 50 grappes et 50 feuilles de même âge et du même niveau sont choisies au hasard parmi les trois pieds de vignes de chaque unité expérimentale. Il est important de travailler avec des vignes possédantes une vigueur homogène. Sur les deux faces d'un rang d'une modalité donnée le pourcentage de feuilles malades pour 50 feuilles

étudiées (*l'incidence ou la fréquence de la maladie, %*) et la zone de feuilles présentant des symptômes de la maladie (*l'intensité d'attaque, %*), en utilisant des exemples d'échelles présents ci-dessus (Figure 7), sont notés.

Pour analyser l'intensité de la maladie entre les modalités, le traitement de données est effectué selon la méthodologie développée par La Torre *et al.* (2012).

L'intensité de la maladie (degré d'infection, DI) est calculée en utilisant une échelle de sept classes (1-7) en utilisant la formule Townsend-Heuberger :

$$DI (\%) = \sum_1^i (n_i \times v_i) / N \times V$$

où : v_i – classe d'intensité ;
 n_i = nombre des feuilles dans cette classe ;

N- nombre total des feuilles ;

V- classe la plus élevée.

L'aire sous les courbes de progression de la maladie (area under disease progress curves, AUDPC) basée sur l' **intensité de la maladie** est calculée pour chaque traitement :

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

où : y_i - intensité de la maladie pour l'observation i ;
 y_{i+1} - intensité de la maladie pour l'observation $i+1$;
 n - nombre total des observations ;
 $t_{i+1} - t_i$ - nombre des jours entre deux observations.

Les valeurs AUDPC sont normalisées en divisant chaque valeur AUDPC par la superficie totale de la courbe (= le nombre de jours de la première à la dernière évaluation de la maladie $\times 1,0$).

Les données en pourcentage de la **fréquence de la maladie** sont transformées en racines carrées d'arcsin selon la formule : $Y = \arcsin(\sqrt{(x\%/100)})$ afin de corriger la normalité avant l'analyse

Les données ainsi obtenues sont soumises à l'analyse statistique en utilisant le test ANOVA, un test paramétrique et un test de Tukey avec un seuil alpha de 5% en utilisant le logiciel R.

L'indice de l'efficacité des traitements est ensuite calculé en utilisant la formule d'Abbott :

$$\% \text{ d'efficacité} = [(I_c - I_t) / I_c] \times 100$$

Où : I_c - incidence de la maladie sur le témoin non traité ;

I_t - incidence de la maladie sur le traitement t .

Seules sont prises en compte les données de l'expérimentation où les intensités d'attaque sur les témoins sont significatives (> 25 %) (Hebrard *et al.* 2013).



Figure 7: *Plasmopara viticola*: pourcentage de surface foliaire atteinte

2.6. Dispositif expérimental et modalités de l'essai pour l'étude de l'effet des préparations sur la vigueur de la vigne

Le but de l'expérience est d'identifier l'effet de différents traitements à base d'*Equisetum arvense* sur la vigueur de la vigne, utilisée comme un indicateur de la sensibilité de la vigne à l'agent pathogène du mildiou *Plasmopara viticola*. En conséquence, l'essai possède un seul facteur à cinq niveaux: DEA, DEAF, D5, LD, Témoin (T). 15 unités expérimentales de 52 m² (la composition de deux unités expérimentales décrites pour la notation du mildiou) ont été identifiées par groupe de 5 dans chacun des 3 blocs (A : parcelle Pinot Noir T ; B : parcelle Chardonnay T ; C : parcelle

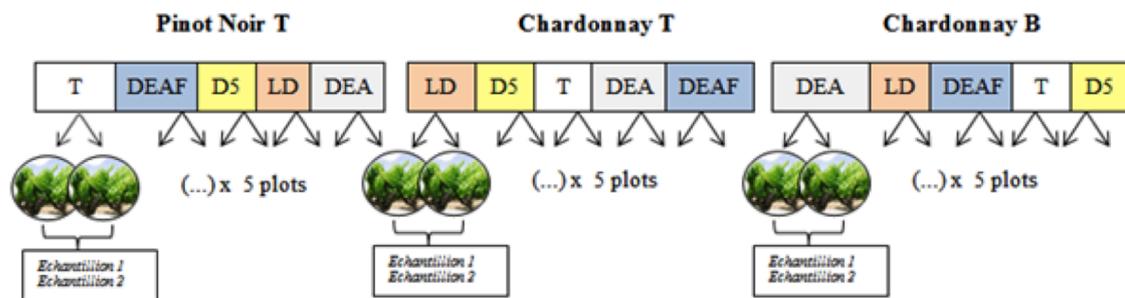


Figure 8: Une représentation schématique du dispositif expérimental

Chardonnay B). Les traitements ont été attribués au hasard à chaque unité expérimentale au sein de chaque bloc. Deux échantillons pour chaque variable étudiée ont été identifiés pour la suite des mesures. Ainsi, pour les variables étudiées relatives à la surface foliaire de la vigne un échantillon se compose de deux pieds de vigne représentatifs de l'ensemble des vignes pour une unité expérimentale. Pour les variables relatives à la densité du couvert végétale de la vigne, ce sont des vignes centrales de chaque micro-parcelle de 26 m² au sein des unités expérimentales qui ont composées les deux échantillons. Pour les mesures de l'indice azoté de la vigne, les trois pieds représentatifs de chaque micro-parcelle de 26 m² au sein des unités expérimentales ont été utilisés pour servir d'échantillons dans les analyses statistiques. Par conséquent, l'essai a été organisé selon un dispositif en blocs aléatoires complets équilibrés (blocs randomisés) avec sous-échantillonnage (Figure 8).

2.7. Mesures et traitements des données: estimation de la vigueur de la vigne

2.7.1. Surface foliaire

Il existe de nombreuses méthodes pour mesurer la surface foliaire de la vigne (Tregoat *et al.*, 2001), cependant seulement des méthodes non-destructives pouvaient être employées dans notre cas, car le prélèvement excessif des feuilles aurait pu entraîner un stress complémentaire pour la vigne.

Par conséquent, l'estimation **de la surface foliaire totale (SFt) au moyen des longueurs de nervures latérales supérieures** (Equation 1) selon la méthode de Carbonneau (1976), a été effectuée. Ce choix repose sur le fait que l'estimation de la surface foliaire primaire et secondaire de la vigne à l'échelle d'un rameau réalisée au moyen de cette méthode est bien corrélée avec la valeur de la surface foliaire mesurée par un planimétrie (précision de 90-95%, Tregoat *et al.*, 2001). Cette méthode était la plus adaptée pour notre cas, notamment concernant le nombre d'individus étudiés ainsi que la quantité des feuilles contrôlées.

En s'appuyant sur le travail de Murisier (1996), un échantillon de 2 ceps par répétition et par modalité a d'abord été identifié, ce qui représente environ 25% des individus par répétition. Pour la suite des mesures on choisit 2 rameaux principaux représentatifs par cep (à l'œil nu) ce qui représente environ 25 -50% des rameaux principaux de l'individu. Cela est suffisant selon Cuevas García (2001). Le fait d'effectuer des mesures sur toutes les feuilles d'un rameaux ou sur 1/3 des feuilles n'influe pas considérablement sur la précision de la mesure (la corrélation est de 86% avec la méthode de référence, Tregoat *et al.*, 2001). Par conséquent, l'échantillonnage des feuilles contrôlées a été effectué selon Carbonneau (1976 b): à partir d'une feuille de rang N, celles de rang N+4, N+8, N+11, N+15, N+18, N+23, N+28, N+33 etc. ont été mesurées. La première feuille de la base ainsi que les petites feuilles n'ont pas été prises en compte.

Pour obtenir la surface totale (SFt) d'une feuille, la formule suivante a été utilisée (Equation1):

$$A = \varphi (L_1 + L_2)^2$$

Où L_1, L_2 sont des longueurs des nervures des deux lobes latéraux supérieurs ; φ est un coefficient obtenu à l'aide de trois paramètres variétaux (allongement, écartement des nervures et découpe du limbe).

L'estimation du coefficient φ propre au Chardonnay et au Pinot noir a été effectuée à partir des 40 feuilles provenant des parcelles d'étude. Elles ont été scannées et leur surface exacte a été déterminée à l'aide de Photoshop. Par régression entre les longueurs des nervures et les surfaces, les coefficients φ ont été déduits. Ainsi, le coefficient de corrélation de Pearson, permettant de rechercher une liaison entre la surface d'une feuille (Y) et la somme des longueurs des nervures (X) était de 97-98% dans les trois cas étudiés avec une p-value très faible, ce qui signifie que les variables sont liées avec une intensité de liaison élevée, ce qui confirme les conclusions de Carbonneau (1976). Selon Carbonneau (1976), Y s'obtient à partir de X de la manière suivante : $Y = \varphi * X$.

Puisque les données Y et X sont distribués normalement (shapiro.test : p-value>5%) on a pu établir une régression linéaire de type $Y = \varphi * X$ (logiciel R) afin d'estimer le coefficient φ (Tableau 3).

Tableau 3: Résultats d'estimation des coefficients propres aux parcelles d'étude

Parcelle	φ	P-value
Chardonnay Bret	0,3544	<2e-16 ***
Chardonnay Tripoz	0,3709	<2e-16 ***
Pinot Nor Tripoz	0,4062	<2e-16 ***

La valeur moyenne de la surface totale (SFt) des feuilles échantillonnées selon la méthode décrite ci-dessus a été multipliée par le nombre de feuilles sur le rameau étudié ainsi que par le nombre de rameaux principaux présents sur le pied étudié afin de connaître la surface totale des feuilles par cep (m²/cep).

En ne considérant que les rameaux primaires utilisés précédemment, l'entassement de la végétation (surface des feuilles des rameaux secondaires) a été apprécié en prenant en compte toutes les feuilles développées de tous les entre-cœurs par rameaux. Ensuite afin d'estimer l'entassement de la vigne le rapport de la surface foliaire des rameaux secondaires sur la surface foliaire totale a été calculé.

La mesure de la surface foliaire doit être effectuée à la fin de la période végétative de la vigne. Dans notre travail cette mesure a été réalisée une fois à la fin juillet.

2.7.2. Densité du couvert végétal

La densité du couvert végétal a été évaluée au niveau de la grappe à l'aide de la méthode du point quadrat (Smart *et al.*, 1990), lorsque le couvert est entièrement développé (entre la véraison et la récolte). Une aiguille en acier (1,3mx 5 mm) a été introduite horizontalement au travers du couvert végétal de la vigne à la hauteur de la zone de fruits et le nombre de feuilles (F), de grappes (G) et de trous (T) interceptés par le bout de l'aiguille ont été notés. Seules les vignes centrales sur chaque rang pour chaque unité expérimentale ont été utilisées. Trente insertions par échantillon de chaque modalité ont été réalisées avec un intervalle de 10 cm entre deux insertions. Le premier et le dernier F ou G ont été considérées comme extérieures lors des calculs. Ensuite le pourcentage des trous ((T total/30 insertions) * 100= X % des trous), le nombre de niveaux de feuilles (nb total des feuilles touchées /30 insertions), le pourcentage des feuilles intérieures (nb total des feuilles touchées moins les feuilles extérieures touchées pour chaque insertion/nb total des feuilles touchées*100) ont été calculés.

2.7.3. Indice de statut azoté de la vigne

L'indice de statut azoté a été mesuré à l'aide d'un N-tester. Cet appareil optique mesure l'intensité de la coloration verte du limbe qui dépend de la teneur en chlorophylle de la feuille (Spring, 1999). Les mesures du statut azoté de la vigne ont été effectuées sur 30 feuilles adultes de rameaux principaux et secondaires dans la zone principale de la vigne selon la méthode décrite par Spring et Zufferey (2000). L'indice de statut azoté de la vigne a été mesuré trois fois (juin, juillet, août).

2.7.4. Analyse de données concernant la vigueur de la vigne

Les données ont été préparées et analysées à l'aide du logiciel R et de Microsoft Excel. L'analyse de variance a été effectuée afin d'identifier les différences significatives entre les effets des différents traitements sur les variables relatives à la vigueur de la vigne.

Afin d'analyser les valeurs individuelles (les valeurs issues des échantillons), un modèle statistique a dû être conçu. Au vu du dispositif expérimental construit, les parcelles (blocs), les traitements (facteur), les plots (unités expérimentales) et les échantillons ont été traités en tant que facteurs. Selon Kutner *et al.* (2005) cette analyse peut être effectuée seulement pour des données qui n'ont pas d'interaction bloc-traitement.

Dans le cas général, un modèle *réponse~parcelle+traitement+plot+plot/sample* pourrait être utilisé (et pas le modèle *réponse~parcelle+traitement+plot+sample*, car cela ne reflète pas notre dispositif expérimental avec sous-échantillonnage). Néanmoins, R ne peut pas reconnaître correctement ces facteurs. Pour cela, le modèle a été ajusté. Afin de distinguer un effet de l'unité expérimentale (plot) une interaction entre celle-ci et un facteur (traitement) a été mis en place, puisque chaque traitement apparaît seulement une fois dans chaque unité expérimentale. Les combinaisons entre les plots et les types de traitements suffisent afin d'identifier l'unité expérimentale.

Le code R est donc :

```
library(nlme)
mydata$plot.id <- interaction(mydata$facteur,mydata$plot)
```

De plus, chaque échantillon a dû être identifié comme sous-échantillon du modèle:

```
mydata$sample.id <- interaction(mydata$plot.id,mydata$sample)
```

En enfin, le modèle pour les analyses statistiques de données a été conçu:

```
réponse ~ parcelle+ facteur, random=~1 | sample.id.
```

III. Formation des chromatogrammes à partir des feuilles des vignes

La formation des chromatogrammes à partir des feuilles des vignes a été réalisée en suivant le test de Morpho-Chromatographie développé par Kolisko L, Pfeiffer E.E. et adapté par Perumal K. (en Inde) et Gelin J.P. (en France) et autres.

Les échantillons utilisés à cette fin proviennent d'une seule parcelle d'étude (Chardonnay B), car le but n'est pas de mener une étude exhaustive mais de comprendre si un test holistique peut compléter les résultats analytiques. Ainsi, quatre feuilles par unité expérimentale de chaque modalité (deux unités expérimentales par modalité) ont été échantillonnées. Ces feuilles proviennent des rameaux principaux (rang N+3, N+4) des ceps représentatifs et homogènes. La modalité Cuivre a été incluse dans cette expérience également. Les feuilles ont été lavées, coupées et broyées avant d'être soumises à l'extraction par la soude (NaOH, 0,1%). Cette solution a été utilisée pour l'expérience plus tard.

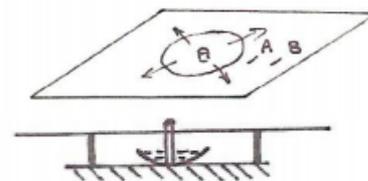


Figure 9: Illustration d'un papier filtre pour l'expérience

D'abord les papiers circulaires (W1, Ø 15cm) avec une mèche (W1, 2x3 cm) introduite dans un trou de 3-5 mm au milieu du papier ont été imprégnés de la solution de nitrate d'argent (0,5%) jusqu'au tait A (4 cm) (Figure 9). Le mécanisme physique sous-jacent est la capillarité. Après avoir retiré et séché les papiers, on fait monter la solution à tester (l'extraction des feuilles) jusqu'à la limite B (6 cm). L'étape finale consiste en la révélation de l'image ainsi obtenue sous le rayonnement UV (Pfeiffer, 1984 ; Ballivet et Gelin, 2007). Il faut noter que l'expérience se déroule dans des conditions de température et d'humidité contrôlées. Chaque échantillon a été répété deux fois afin de confirmer la reproductibilité de l'image. Une image de la soude (0,1%) a été utilisée comme base de comparaisons pour les interprétations. Une recherche préalable de la concentration de la solution à tester a été effectuée. Ainsi les meilleures images ont été obtenues avec 2, 5 g de la matière fraîche des feuilles et 100 ml de la soude (0,1%).

Les résultats de ce test ne feront pas objet d'analyses statistiques, car l'état de connaissances actuel n'a pas permis encore de caractériser et d'expliquer de façon exhaustive toutes les formes et couleurs d'un chromatogramme. Une simple appréciation visuelle et artistique (très subjective) sera effectuée.

IV. Récapitulatif de variables étudiées lors de l'étude

Toutes les variables étudiées lors de l'étude sont répertoriées dans le tableau ci-dessus :

Tableau 4: L'ensemble des variables étudiées lors de l'essai

Essai	Variables étudiées	Concernent
Germination des oospores du mildiou dans des conditions contrôlées	<i>date d'arrivée à maturité des oospores du mildiou</i>	Capacité de dispersion du <i>Plasmopara viticola</i>
	<i>nombre de sporanges par dix fragments de 2 mm²</i>	
Essai en plein champs	<i>incidence ou fréquence de la maladie, %</i>	Notations du mildiou de la vigne (<i>n'ont pas été effectuées, car absence de maladie</i>)
	<i>intensité d'attaque, %</i>	
	<i>densité du couvert végétal :</i> - % des trous ; - nombre de niveaux de feuilles ; - % des feuilles intérieures ;	Estimation de la vigueur de la vigne et, par conséquent, de la sensibilité de celle-ci au mildiou
	<i>surface foliaire secondaire totale/surface foliaire totale, m²</i>	
	<i>indice de statut azoté de la vigne</i>	
	<i>les images de Morpho-Chromatographie des feuilles des vignes</i>	

4^{ème} PARTIE : RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS DE DONNEES

I. Germination des oospores dans des conditions contrôlées

Le but de cette étude était de déterminer le taux de germination des oospores et le temps nécessaire pour cela en fonction des différents traitements appliqués.

Les premiers échantillons ont été prélevés le 20 avril (lot 1) et sur ces échantillons la germination des sporanges a commencé le quatrième jour (48 h < T < 144 h) et a continué encore trois jours, représentant 38% du nombre total des sporanges produits pendant la période de l'essai (quatre lots en total) (Figure 10).

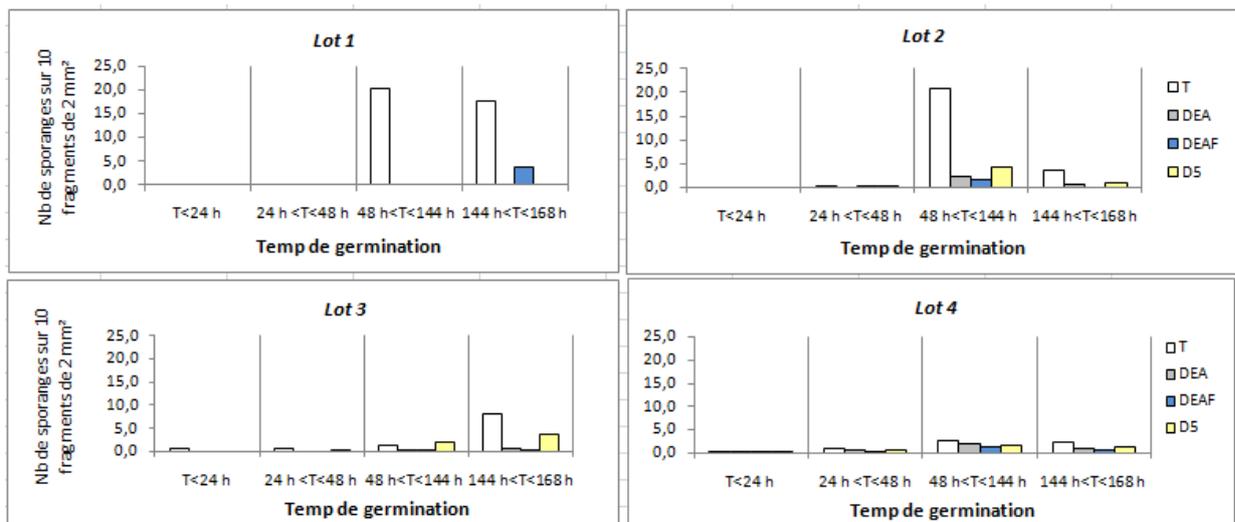


Figure 10: Évolution de la germination des oospores du *Plasmopara viticola* pendant le période de l'essai

Les échantillons du 27 avril (lot2), du 4 (lot 3) et du 11 mai (lot 4) représentent respectivement 31%, 16% et 15 % du nombre total de sporanges produits pendant toute la période de l'essai. Selon Jermini *et al.*, 2003, le taux de germination des oospores après la mi-juin est très faible et à partir de juillet on n'observe plus de sporanges issus de la contamination primaire. Par conséquent, l'observation de la germination des oospores a été menée jusqu'à 11 mai.

Les données obtenues suite à cette étude montrent que les oospores entre les fragments d'un même échantillon (lot) indépendamment des traitements appliqués ont besoin de temps différent pour la germination, même dans des conditions contrôlées. Chez Jermini *et al.*, 2003 la différence de temps de germination des oospores entre les fragments des feuilles la plus importante était de 22 jours. Dans notre cas l'observation de chaque échantillon (lot) n'a pas pu être menée jusqu'à la fin de l'éclosion des oospores, néanmoins même pendant les 7 jours d'étude, des variations importantes au sein de chaque échantillon ont été observées. La variation du temps de germination des oospores au sein d'un échantillon pour une modalité donnée peut être due au nombre différent des oospores présents par fragment de feuille. La diminution de la germination des oospores pour certaines modalités (Figure 10) au cours de la saison peut être attribuée à la progression de la sporulation qui aurait pu apparaître dans les tubes à mildiou, mais aussi à la diminution de la capacité de germinative des oospores (Jermini *et al.*, 2003).

L'efficacité des traitements a été évaluée de façon indirecte au moyen des variables étudiées à savoir le **temps nécessaire pour les premières germinations des oospores** et le **nombre total des sporanges produits pour dix fragments des feuilles de 2 mm²** et de façon directe à l'aide de la formule

d'Abbott ($\text{Efficacité modalité} = (1 - \text{Intensité d'attaque modalité} / \text{Intensité d'attaque sur TNT}) \times 100$) (Hebrard *et al.* 2013). Les tests statistiques ont été effectués sur le logiciel R, sachant que les quatre dates de mise en culture des échantillons (lots) ont été considérées comme quatre blocs, puisqu'elles sont effectuées dans des conditions contrôlées (avec un intervalle de temps d'une semaine). Les tests statistiques ont été réalisés avec un seuil de significativité α de 5 % (il y a 5 chances sur 100 de se tromper en concluant sur une différence significative entre les effets de traitements).

1.1. Nombre total de sporanges produits

Il a été noté que la variation du nombre de sporanges a été importante entre les jours de mise en culture des fragments des feuilles, mais aussi entre les traitements (facteurs) (Figure 11).

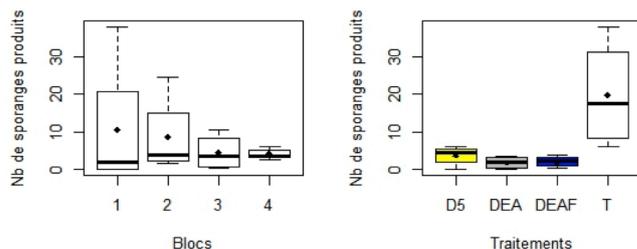


Figure 11: Boîtes à moustaches du nombre total de sporanges produits par dix fragments de 2 mm² par traitement et par bloc

La question à laquelle on veut répondre est de savoir si les variations de moyennes observées sont dues aux effets des traitements ou si elles sont dues au hasard. Afin de répondre à cette question le test statistique ANOVA calcule le paramètre F, qui compare la variation entre les moyennes des groupes (entre les traitements dans notre cas) et la variation des valeurs individuelles au sein de ces groupes. Pour procéder à la vérification d'égalité des moyennes de la variable étudiée (*le nombre total de sporanges produits*) entre les traitements à l'aide du test ANOVA la normalité des données a été d'abord vérifiée au moyen du test de Shapiro ($p > .05$ pour toutes les modalités), qui a confirmé que les valeurs de la variable étudiée suivent une loi normale. Ainsi, le test ANOVA a été utilisé afin de tester s'il y a un effet significatif du type de traitement sur la variable étudiée. On construit pour cela le modèle suivant : `anova<-lm(cumul ~ facteur + bloc, data =mydata)`.

Néanmoins, pour valider la mise en place du modèle, certaines conditions doivent être remplies. Premièrement : la normalité des résidus. À l'aide d'un test de Shapiro sur les résidus du modèle ($p > .05$), l'hypothèse de normalité est donc validée. Deuxièmement, l'homogénéité des variances doit être vérifiée. Pour cela la représentation graphique des résidus en fonction des valeurs estimées de la réponse est un outil approprié : le graphique en haut à gauche montre que les résidus suivent une certaine tendance, alors qu'ils devraient suivre la même dispersion entre les modalités (Figure 12). De plus, il y a une tendance entre les valeurs des résidus et les valeurs prédites par le modèle (le graphique en bas à gauche, Figure 12). Ce phénomène est appelé

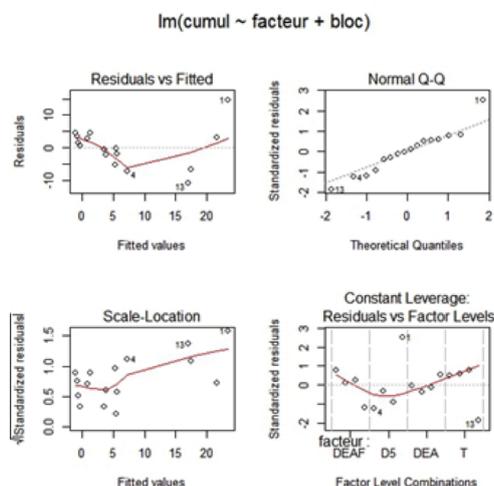


Figure 12: Description des résidus du modèle pour l'analyse de la variable i.e. le nombre total de sporanges produits

hétéroscédasticité. Il signifie que la variance n'est pas homogène entre les groupes, et qu'elle est en relation avec la taille de réponse.

On ne peut donc pas avoir recours au test classique ANOVA. Une hétérogénéité de variance peut produire un taux d'erreur de première espèce sérieusement différent du taux nominal α . Si les variances sont hétérogènes, la différence de variances risque d'être confondue avec une différence de moyennes. Une transformation non linéaire des données ($X'=\log(x)$ ou $X'=\text{racine}(x)$) permet souvent d'homogénéiser des variances. Cependant, les variances même transformées ne sont pas homogènes dans notre cas.

Malgré les conditions manquantes quant à l'emploi rigoureux du test ANOVA, la table d'ANOVA (*anova (anova)*) a montré un effet significatif des traitements appliqués sur le nombre total de sporanges produits ($F(3, 9) = 4.99, p < .05$), tandis que l'effet de bloc (lot) n'était pas significatif ($F(3, 9) = 0.64, p > .05$). A l'aide d'un graphique (Figure 13) on peut observer que tous les traitements ont une influence sur la variable étudiée (*le nombre total de sporanges produits*), il est donc intéressant de déterminer quelles groupes (traitements) sont significativement différents entre eux. Les tests POST HOC ont donc été effectués. Ceux-ci ont montré qu'il y a une différence significative entre la modalité témoin (T) et les modalités DEA et DEAF (au risque α de se tromper), par contre il n'y a pas de différence significative ni entre le témoin (T) et la modalité D5, ni pour DEA, DEAF, D5 entre eux (Figure 14).

Puisque la condition d'homogénéité des variances n'est pas respectée, un test de comparaison des moyennes non-paramétrique a été également appliqué afin de comparer les résultats obtenus (*friedman.test(cumul ~ facteur | bloc, data = mydata)*). Ainsi, le facteur p étant inférieur à 0.05, on peut conclure que les valeurs de la variable étudiée sont influencées par les traitements appliqués. Il est possible également de réaliser des comparaisons multiples de moyennes (*friedman(bloc, facteur, cumul)*) (Figure 15).

Il est important de noter que les deux tests de comparaisons multiples des moyennes (paramétrique et non-paramétrique) trouvent un nombre total de sporanges produits sur des fragments des feuilles venant de la modalité témoin non-traité (T) significativement supérieur à celui des autres modalités. Néanmoins, le test non-paramétrique a montré qu'il y a une différence significative entre la modalité D5 et le témoin (T), tandis que le test paramétrique n'a pas trouvé cette différence.

Enfin la puissance du test a posteriori a été évaluée afin de vérifier son aptitude à obtenir un résultat statistiquement significatif si les traitements sont réellement efficaces. La puissance est de 79% (*power.anova.test(groups=4, n=4, between.var=var(meancumul), within.var=60.05, sig.level= 0.05, power=NULL)*), ce qui est tout à fait convenable.

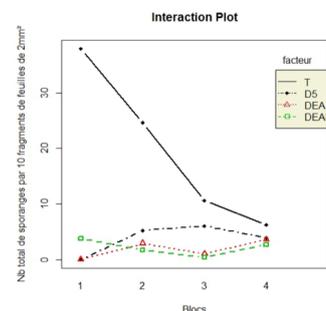


Figure 13: Interactions entre les facteurs de la variable étudiée

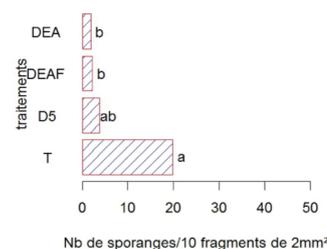


Figure 14: Comparisons multiples des moyennes (issues du test paramétrique) de la variable étudiée

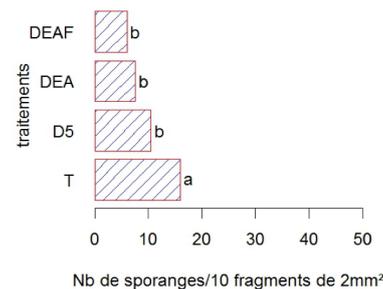


Figure 15: Comparaison multiples des moyennes (test non paramétrique) de la variable étudiée

Pour les autres variables étudiées les démarches concernant l'application du test ANOVA ont également été effectuées, cependant, seuls les résultats importants seront présentés dans les paragraphes qui suivent.

1.2. Temps nécessaire pour les premières germinations des oospores

La description graphique des données (Figure 16) permet de montrer que la variation du temps de germination des oospores entre les blocs (lots) est importante, mais on observe également des tendances entre les traitements. Ce ne sont que des observations qu'il faut confirmer à l'aide des tests statistiques.

Comme dans le cas précédant le test d'ANOVA a été utilisé pour cela. Un effet principal du bloc, $F(3, 9) = 21.24$, $p < .05$ a été confirmé, par contre l'effet du traitement appliqué ($F(3, 9) = 3.12$, $p = .081$), n'est pas significatif au risque α ($\alpha=5\%$) de se tromper.

Le graphique décrivant une interaction entre les facteurs et la variable étudiée (*le temps de germination*) (Figure 17, à gauche) montre qu'il est intéressant de déterminer quels traitements sont différents entre eux. Les tests statistiques montrent que les oospores des fragments des feuilles qui n'ont reçus aucun traitement ou qui ont reçus les traitements DEA, DEAF ou D5, n'ont pas besoin de temps significativement différent pour la germination

(au risque α de se tromper) (Figure 17, à droite). La puissance du test a posteriori a été évaluée afin de vérifier l'aptitude du test ANOVA d'obtenir un résultat statistiquement significatif si les traitements ont réellement un effet sur la variable étudiée. Ainsi, la puissance est de 57% ($power.anova.test(groups=4, n=4, between.var=var(meancumul), within.var=0.34, sig.level=0.05, power=NULL)$), ce qui n'est pas suffisant pour pouvoir conclure sur l'absence ou la présence de l'effet des traitements.

1.3. Efficacité des traitements : formule d'Abbott

Toutes les stratégies montrent une efficacité par rapport au témoin non traité, mais la variabilité est importante entre les blocs (Figure 18). Quant aux résultats du test ANOVA, nous avons observé un effet principal du bloc (le jour de la mise en culture), $F(3, 6) = 7.29$, $p < .05$. En revanche, nous n'avons pas observé d'effet du traitement appliqué sur l'efficacité observée, $F(2, 6) = 2.02$, $p = .21$.

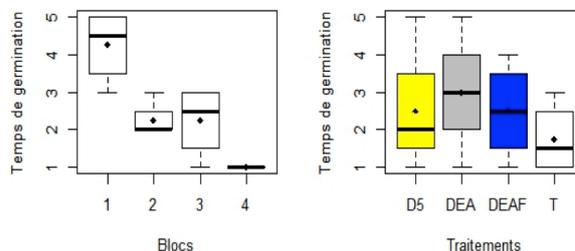


Figure 16: Boîtes à moustaches du temps des premières germinations des oospores (jours) par traitement et par bloc

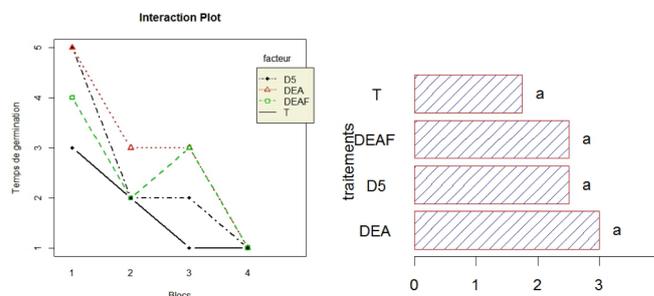


Figure 17: Interaction entre les facteurs (à gauche) et les résultats du test de Tukey : groupes homogènes (à droite) de la variable étudiée i.e. le temps des premières germinations des oospores

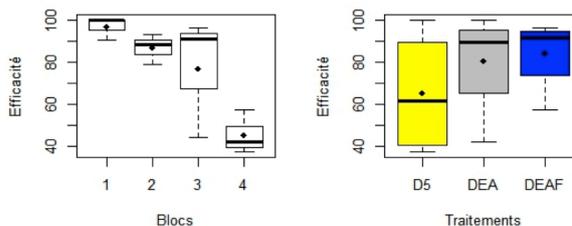


Figure 18: Boîtes à moustaches d'efficacité des traitements par rapport au témoin non-traité par traitement et par bloc

1.4. Conclusions : germination des oospores dans des conditions contrôlées

Pour conclure, les traitements à base d'*Equisetum arvense* ont un effet significatif sur le nombre total de sporange produits par dix fragments de 2 mm², et donc sur la capacité de dispersion du pathogène. On peut également conclure que les traitements ont un effet antigerminatif sur le pathogène, en s'appuyant sur la littérature analysée et sur nos résultats. De plus, une différence entre les modalités DEA, DEAF par rapport au témoin non-traité a été observé (d'après le test paramétrique). Une augmentation du nombre des répétitions peut aider à affiner les résultats. Quant à la deuxième variable étudiée, à savoir le temps nécessaire pour les premières germinations des oospores, la puissance du test est insuffisante pour pouvoir conclure sur un effet significatif des traitements à base d'*Equisetum arvense* sur cette variable. L'efficacité des traitements calculée selon la formule d'Abbott n'est pas non plus significativement différente entre les modalités étudiées. La faible puissance du test ainsi que la différence importante entre les jours de mise en culture des échantillons (blocs) empêchent de voir cet effet s'il existe réellement.

II. Vigueur de la vigne

2.1. La surface foliaire

L'estimation de la surface foliaire des vignes a été réalisée une fois fin juillet. Toutes les variables relatives à la surface foliaire semblent avoir une variabilité importante entre les échantillons (Tableau 5). Pour affiner les résultats obtenus les analyses statistiques ont été effectuées avec pour modèle utilisé : *lme(rep ~ field + facteur, random=~1 | sample.id, data=mydata)* (voir 3ème PARTIE 2.8), où « field » correspond aux parcelles étudiées (A: Pinot Noir T; B: Chardonay T; C :Chardonnay B), « facteur » aux modalités testées (DEA, DEAF, D5, LD et T (témoin non traité)), « sample.id » aux sous-échantillons aux sein des unités expérimentales.

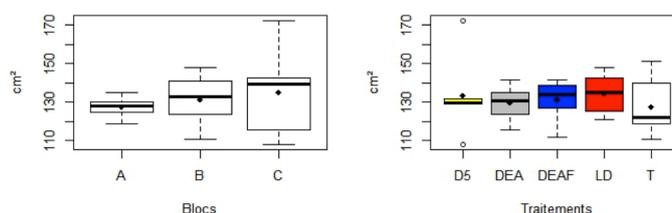


Figure 19: Boîtes à moustaches de surface moyenne d'une feuille principale par bloc et par traitement (cm²)

Tableau 5: Mesure de la surface foliaire moyenne d'une feuille principale, de la surface foliaire totale par souche et par m² de sol, de la part des entre-cœurs par les modalités étudiés (moyenne générale)

Modalité	Surface moyenne d'une feuille principale (cm ²)	SFT par cep (m ²)	SFT par m ² du sol (m ²)	Part de la SFT des entre-cœurs (%)
Témoin	127,5 ± 15,2	2,6 ± 0,5	2,1 ± 0,4	43,7 ± 6,6
DEA	129,4 ± 9,4	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,1	24,6 ± 8,9
DEAF	131,1 ± 10,7	2,5 ± 0,6	2,0 ± 0,5	35,9 ± 11,2
D5	133,3 ± 21,2	2,2 ± 0,6	1,8 ± 0,5	33,1 ± 4,9
LD	134,5 ± 11,0	2,5 ± 0,7	2,0 ± 0,5	34,5 ± 7,3

La surface moyenne d'une feuille principale semble être influencée par des traitements (Figure 19). Néanmoins, des disparités assez importantes au sein des modalités (*variance résiduelle*) ne permettent pas de conclure sur la présence d'effet significatif des traitements sur la surface moyenne des feuilles principales. La statistique *F* pour l'hypothèse de l'absence de différence entre les valeurs moyennes de surface des feuilles principales est de 0.23 avec une p-value de 0.92 ($F(4, 8)=0.23$ p=. 92). La

puissance du modèle est faible (de 8 %). Néanmoins, vu que le modèle permet d'expliquer 88% de la variation résiduelle (fonction: $VarCorr(result3)$), on peut conclure que l'effet de traitement sur la variable étudiée n'est pas statistiquement significatif.

La surface foliaire totale des vignes, quant à elle, ne montre pas non plus de différence significative entre les traitements appliqués ($F(4,8)=0.79, p=.54$). La puissance du modèle est à nouveau trop faible (25%) pour pouvoir conclure sur l'effet des traitements ou son absence. De plus, dans les deux cas la variation au sein des échantillons est plus importante que la variation entre les groupes (traitements) (Figure 20). Cependant, le modèle appliqué a permis d'expliquer 86% de la variance résiduelle. Ainsi, pour augmenter la puissance du test une augmentation du nombre de répétitions pourrait être envisagée.

La part des entre-cœurs qui renseigne indirectement sur le degré d'entassement du feuillage, représente de 13 à 57 % de la surface foliaire totale des vignes sur l'ensemble des modalités (Figure 21). Cette variable, au contraire de la précédente, est significativement influencée par le type de traitement ($F(4,8)=5.16, p<.05$). La puissance du modèle est de 96% (n=6) ce qui permet de conclure que dans 96 de cas sur 100 le modèle employé pourrait trouver un effet significatif des traitements à base d'*Equisetum arvense* sur l'entassement du feuillage, si celui-là existe réellement. Un effet de bloc sur la variable étudiée est également significatif ($F(2,8)=3.49, p<.05$), ce qui traduit que la part des entre-cœurs dans la végétation dépend du type de traitement appliqué, mais également de la parcelle de l'étude. Les résidus du modèle suivent la loi normale (Shapiro-Wilk normality test : $p>.05$) et leur variance est homogène, mais pas indépendante (Figure 22). Le modèle explique 88% de la variation résiduelle. Le modèle employé a donc du sens.

Un test de comparaisons multiples des moyennes a été effectué afin de connaître lequel entre les traitements testés influence significativement l'entassement du feuillage. Ainsi, la modalité DEA a montré un taux d'entassement du feuillage significativement inférieur par rapport au témoin non traité. Les autres modalités n'ont pas présenté de différence significative ni par rapport au témoin (T), ni entre elles (Figure 23).

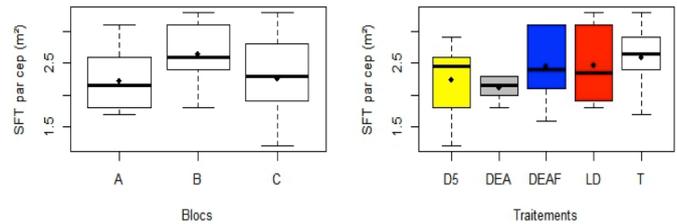


Figure 20: Boîtes à moustaches de surface totale des feuilles par bloc et par traitement (m^2/m^2 du sol)

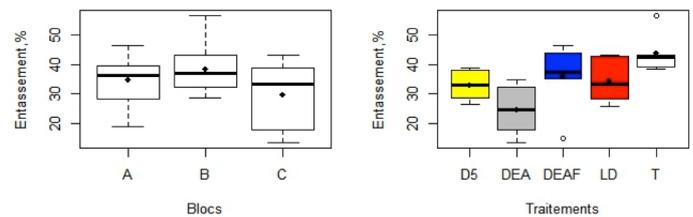


Figure 21: Boîtes à moustaches du rapport de la surface totale des entre-cœurs sur la surface totale par bloc et par traitement, %

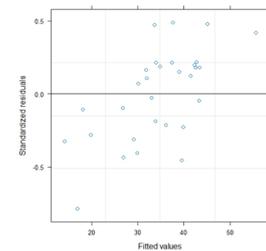


Figure 22: Description des résidus du modèle

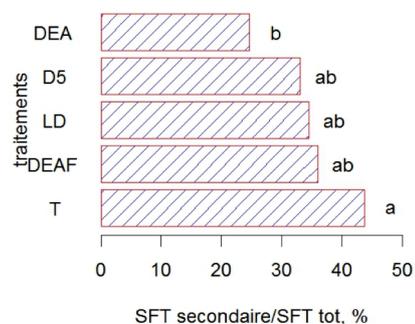


Figure 23: Comparaisons multiples des moyennes de la variable étudiée (i.e. la part des entre-cœurs dans la végétation, %)

2.2. Densité du couvert végétale

En ce qui concerne des variables relatives aux mesures de la densité du couvert végétale des vignes, à savoir le pourcentage de trous dans la végétation, le nombre de niveaux de feuilles et le pourcentage de feuilles inférieures, le modèle $lm(rep.mean \sim field + facteur, data=avg)$ a été employé pour l'analyse de leurs variances, où « field » correspond aux parcelles d'étude (A: Pinot Noir T; B: Chardonay T; C: Chardonnay B), « facteur » aux modalités testées (DEA, DEAF, D5, LD et T (témoin non traité)) et « avg » provient de la fonction $summaryBy(rep \sim field + facteur + plot, FUN=mean, data=mydata)$, qui calcule et groupe les moyennes de deux sous-échantillons des unités expérimentales (plots).

Ainsi, la statistique F de l'effet des traitements sur le pourcentage des trous dans la végétation est de 1.01 avec une p-value de 0.46 ($F(4, 8) = 1.01, p = .46$), tandis que l'effet de bloc sur la variable étudiée est significatif ($F(2,8) = 29.1, p < .05$). Néanmoins, la puissance du test est faible (22%) ($n=3$). La description graphique des données (Figure 24a) permet de visualiser cet effet de bloc prononcé.

La variable étudiée, i.e. le nombre de niveaux de feuilles dans la végétation, a également été significativement influencée par l'effet de bloc ($F(2,8) = 20, p < .05$), mais pas par les traitements ($F(4, 8) = 0.49, p = .74$). La puissance du test est à nouveau très faible (de 13%) ce qui ne permet pas

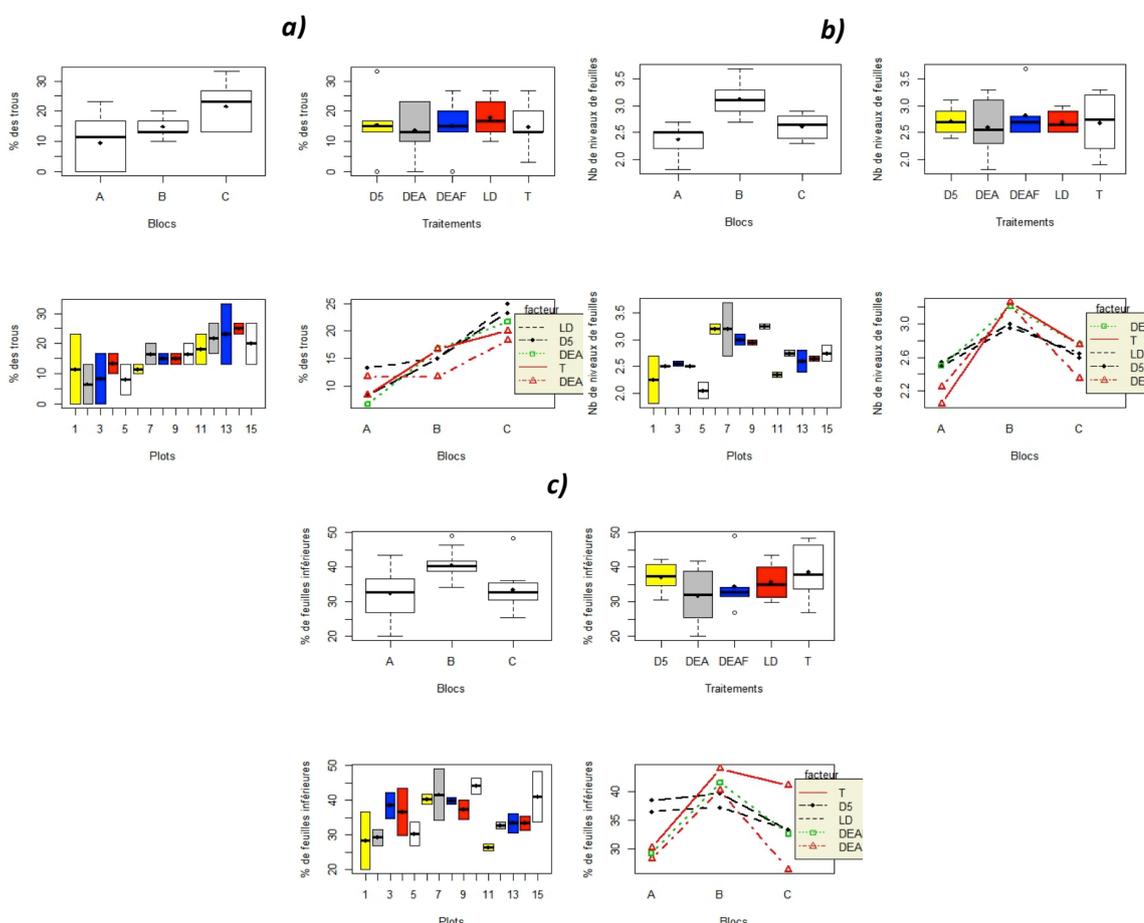


Figure 24: Représentation graphique des valeurs des variables étudiées : a) le pourcentage des trous dans la végétation, % ; b) le nombre de niveaux de feuilles dans la végétation ; c) le pourcentage des feuilles inférieures dans la végétation

conclure sur la validité des résultats. La statistique F pour l'hypothèse de l'absence de différence entre les valeurs moyennes du pourcentage des feuilles inférieures dans la végétation (Figure 24 c) est de 1.2 avec un p-value de 0.38 ($F(4, 8) = 1.2, p = .38$). Par conséquent, les moyennes entre les groupes

étudiées (traitements) ne sont pas significativement différentes. Cela signifie qu'il n'y a pas d'effet significatif de traitement sur la variable étudiée, i.e. *le pourcentage des feuilles inférieures dans la végétation*. Par contre, un effet principal du bloc ($F(2,8)= 5.7, p<.05$) a été observé. En tout état de cause, vu la puissance du test (25% (n=3)) ces résultats ne peuvent pas être considérés comme valables, car seulement dans 25 cas sur 100 le modèle est capable de conclure sur une différence des moyennes (effet de traitement) si celle-là existe réellement.

2.3. Indice de statut azoté de la vigne

Pour l'analyse de cette série de mesures, on a adapté le modèle utilisé précédemment : *lme(rep ~ field+facteur, random=~1 | sample.id, data=mydata)*, où « field » correspond aux blocs A, B, C (parcelles Pinot Noir T, Chardonnay T et Chardonnay B respectivement), « facteur » correspond aux modalités étudiées (DEA, DEAF, D5, LD, T (témoin non-traité)) et « sample.id » aux mesures répétées aux sein de chaque unité expérimentale (*mydata\$sample.id <- interaction(mydata\$plot.id, mydata\$sample)*). La description graphique de données (Figure 25) montre qu'il y a une variation importante entre les blocs étudiée, notamment le bloc B (parcelle Chardonnay T) montre des valeurs de l'indice de statut azoté de la vigne inférieures par rapport aux valeurs des autres parcelles. Le graphique en bas à gauche confirme cette variabilité, malgré les tendances observées entre les valeurs des modalités étudiées au sein du bloc C (parcelle Chardonnay B) qui correspondent aux unités expérimentales (plots) 11-15. On observe également que les valeurs de la troisième mesure qui a été effectuée le 13 août, sont supérieures par rapport aux mesures du 29 juin et 16 juillet (mesures 1 et 2 respectivement).

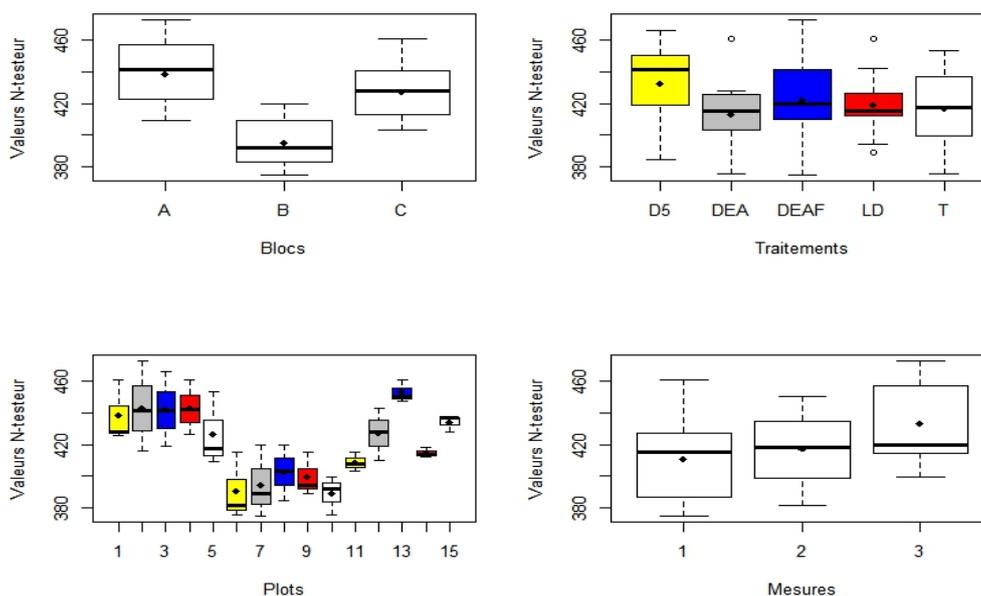


Figure 25: Description graphique des données (indice de statut azoté de la vigne)

Quant à l'analyse de la variance, il n'y pas d'effet significatif des modalités étudiées sur l'indice de statut azoté de la vigne ($F= 1.63, p\text{-value}=0.19$), par contre l'effet du bloc sur la variable étudiée est significatif ($F=25.25, p\text{-value}<.05$). Le modèle employé permet d'expliquer 88% de la variance résiduelle. Ainsi, on peut conclure que l'indice de statut azoté de la vigne ne diffère pas significativement entre les cinq modalités étudiées avec un seuil de signification (risque d'erreur) de 5%.

2.4. Conclusions : vigueur de la vigne et sensibilité de celle-ci au mildiou

Les préparations à base d'*Equisetum arvense* ont montré un effet sur la vigueur de la vigne. Ainsi, la part des entre-cœurs par rapport à la surface totale de la vigne de la modalité DEA (décoction simple) a été significativement inférieure par rapport au témoin non-traité. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre tous les traitements à base d'*Equisetum arvense*. Selon Tregoat *et al.* (2001), le rapport entre la surface foliaire primaire et la surface foliaire secondaire de la vigne permet une estimation précise de sa vigueur. En effet, les souches vigoureuses ont montré un grand développement de rameaux secondaires et donc un entassement de feuillage plus élevé. Puisqu'un entassement important de la végétation est préjudiciable au microclimat des grappes (Smart et Robinson, 1991), on peut conclure que les modalités DEAF, D5, LD et T (témoin non-traité) augmentent la sensibilité des vignes à l'arrivée du mildiou si les autres conditions sont réunies. Néanmoins, du fait que l'augmentation de la vigueur de la vigne grâce à l'application des traitements à base d'*Equisetum arvense* n'est pas mentionnée dans la littérature étudiée et que son mode d'action n'est pas claire, les résultats obtenus doivent être pris en compte pour des expérimentations supplémentaires. Les parcelles de l'étude ont signalé une source de variation importante pour l'analyse de variance. Il faudra également prendre en compte ce facteur lors du choix des parcelles pour les expérimentations suivantes.

Quant aux valeurs de la variable étudiée, i.e. l'indice de statut azoté de la vigne, qui n'a pas montré de différence significative en fonction des modalités appliquées, on peut souligner, pour conclure, que de nombreux facteurs ont été mentionnés dans la littérature pour leur influence sur l'indice azoté (Tableau 6). Leurs effets pourraient être supérieurs à celui l'effet des traitements appliqués.

Tableau 6: Facteurs ayant un effet sur l'indice azoté de la vigne

Facteur	Cité par :
La saison, l'âge des feuilles et le cépage de la vigne	Leeuwen et Friant, 2011
Les troubles physiologique ou maladies de la vigne	Leeuwen et Friant, 2011
L'importance de la surface foliaire et de son agencement dans l'espace	Carbonneau, 1995, cité par Zufferey, 2000
La proximité d'un organe puits	Schultz, 1989, cité par Zufferey, 2000
L'orientation et l'écartement des rangs, la forme et de la hauteur de la haie foliaire	Zufferey, 2000

En ce qui concerne la densité du couvert végétal de la vigne, autre variable étudiée, les mesures ne montrent pas de différences significatives en fonction des traitements appliqués, mais on peut noter que l'effet des parcelles étudiées est significatif dans tous les cas. Ainsi, le nombre de niveaux de feuilles et le pourcentage des feuilles inférieures dans la végétation de la parcelle B (Chardonnay T) sont supérieurs à ceux des autres parcelles, tandis que le pourcentage de trous qui renseigne sur l'aération du couvert végétal a été supérieur dans les vignes de la parcelle C (Chardonnay B). En effet, lors de nombreux observations du terrain les vignes du Domain Céline et Laurent Tripoz (parcelles A et B) ont montré une compaction du feuillage plus importante par rapport aux vignes du Domain La Soufrandière. Effectivement, la vigueur de la vigne dépend beaucoup du contexte pédoclimatique, mais aussi des techniques culturales (Valdes Gomez, 2007). Autant de facteurs qu'il faudra prendre en compte lors des expérimentations dans les années à venir.

III. Interprétation des chromatogrammes des feuilles de la vigne

Une interprétation des chromatogrammes a été effectuée selon Pfeiffer (1984) comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents. Une image formée à partir de la soude (0,1%) sert de modèle de base pour la description des images. Comme il a été décrit dans la Partie III, chaque modalité contient deux répétitions (ou unités expérimentales). Chaque répétition a été reproduite deux fois afin d'évaluer si les images sont reproductibles. Deux répétitions correspondent à deux demi-cercle par unité expérimentale de chaque modalité, comme on peut le voir ci-dessous (Figure 26).

D'un premier coup d'œil on peut constater qu'il existe une différence morphologique entre les images issues d'une même modalité mais d'unités expérimentales différentes. Les modalités avec le numéro 5 correspondent aux vignes de la partie plus haute de la parcelle. On voit que toutes les

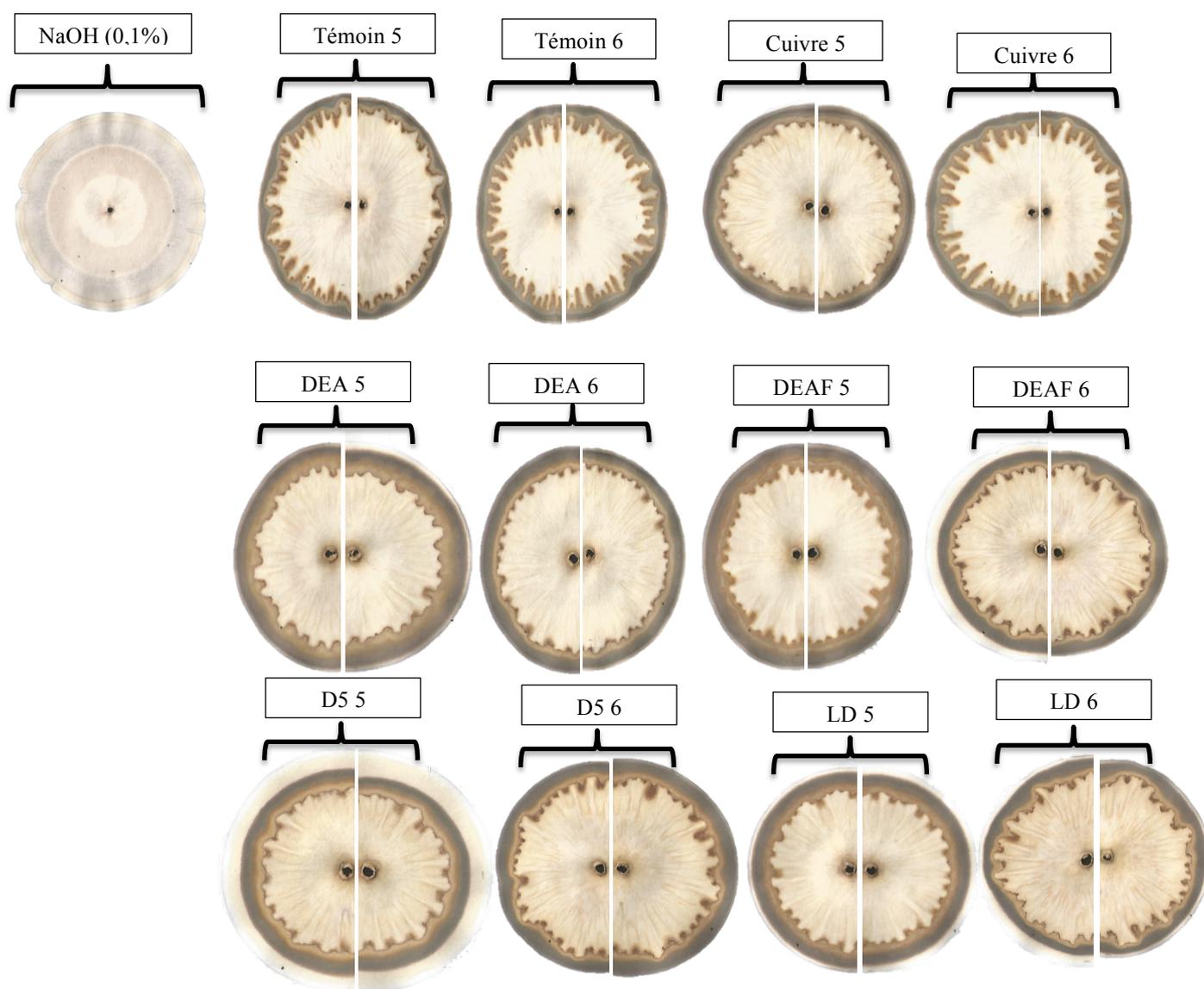


Figure 26: Chromatogrammes à partir des feuilles des vignes provenant de la parcelle Chardonnay B

modalités provenant de cette partie de la parcelle montrent des formes plus simples par rapport à celles de la partie plus basse. Il apparaît donc plus judicieux de comparer les modalités de la partie haute de la parcelle entre elles, de même pour la partie plus basse.

On peut observer que le Témoin 5 possède des formes plus ramifiées par rapport aux modalités Cuivre 5, DEA 5, DEAF 5, D5 5 et LD 5. Par contre la zone intérieure des chromatogrammes de

toutes les modalités « 5 » ne présente pas de différence flagrante, à l'exception de la modalité DEAF 5, dont la structure intérieure est plus atténuée.

Quant aux modalités provenant de la partie plus basse de la parcelle (modalités « 6 »), leurs formes semblent être mieux marquées. Ainsi, les modalités Témoin 6 et Cuivre 6 présentent plus de ramifications par rapport aux autres modalités « 6 ». Par contre une structure intérieure plus développée apparaît dans les modalités DEAF 6, D5 6 et LD 6. On peut également noter que les ramifications bien visibles dans le Témoin 6 et Cuivre 6 s'accompagnent d'une atténuation de la structure intérieure (la couleur moins prononcée, les radiations quasi absentes). Les modalités DEAF6 et LD 6 sont mieux structurées en général, elles présentent un certain équilibre entre la préservation des ramifications extérieures, de la couleur et des formes radiales intérieures. La modalité D5 possède également une bonne structure intérieure mais ses ramifications sont plus massives et moins harmonieuses. Néanmoins, la modalité DEAF 6 présente des formes périphériques plus homogènes que la modalité LD 6.

On observe une tendance d'un passage des formes périphériques dynamiques et d'une absence de structuration intérieure à des formes périphériques plus simple, mais avec une structuration intérieure plus accentuée et des couleurs de la zone plus intenses. Ce passage s'accompagne également d'un épaissement de la zone extérieure et d'une formation d'un anneau brun clair qui délimite les deux zones.

Un anneau blanchâtre entre la zone extérieure et la zone centrale est plus ou moins présent dans toutes les modalités testées de deux parties de la parcelle (y compris pour le Témoin et le Cuivre). Cependant, on peut remarquer que sur les chromatogrammes des modalités recevant les préparations à base d'*Equisetum arvense* les anneaux sont plus larges et plus marqués. Selon Pfeiffer (1984) c'est un signe « de vitalité » de la substance.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans la sixième de ses conférences Rudolf Steiner a décrit la prêle comme un agent capable de maîtriser les cryptogrammes. Les vigneron en biodynamie utilisent des préparations à base de cette plante pour lutter contre le mildiou en particulier. Ainsi, basés sur ce fait et sur la littérature analysée, nous avons émis des hypothèses concernant l'effet des préparations à base d'*Equisetum arvense* sur la capacité de dispersion de l'agent pathogène du mildiou et sur le temps nécessaire pour la germination de ces formations hivernales. En effet, les préparations DEA (décoction simple d'*Equisetum arvense*) et DEAF (décoction d'*Equisetum arvense* préparée selon une méthode du laboratoire WALA) dynamisées pendant 20 min ont montré un effet significatif (au risque $\alpha = 5\%$ de se tromper) sur la production des sporanges par les oospores du mildiou et donc sur sa capacité de dispersion. Deux applications de ces traitements ont permis significativement diminuer la germination des oospores du mildiou par rapport au témoin non-traité (puissance de test de 79%). Quant à la deuxième hypothèse concernant le temps nécessaire pour l'apparition des premières germinations du pathogène, une faible puissance du test (de 57%) n'a pas permis mettre en évidence un effet des traitements sur cette variable étudiée (si cet effet existe réellement). Une augmentation du nombre des répétitions pourrait être une solution pour les prochaines expérimentations.

On a également émis des hypothèses concernant l'influence des préparations sur la vigueur de la vigne et par conséquent sur la sensibilité de celle-ci au mildiou. La modalité DEA (décoction simple) semble « calmer » la vigueur de la vigne par rapport aux autres modalités, ce qui pourrait contribuer à la résistance de la vigne à l'arrivée du pathogène (puissance de 96%). Les facteurs « dilution » et « dynamisation » des préparations biodynamiques à base de prêle des champs n'ont pas été étudiés. Peut-être sont-ce des pistes de réflexion pour comprendre leurs modes d'action et leur efficacité.

Le développement du mildiou dépend surtout des facteurs environnementaux, principalement d'ordre climatique. Jusqu'à la mi-août aucune pression de la maladie n'a été relevée et l'effet des traitements sur la fréquence et l'intensité du mildiou n'a donc pas pu être évalué. On a vu également que la vigueur de la vigne dépend beaucoup du contexte pédoclimatique et des techniques culturales. Ces facteurs qu'il faudra prendre en compte lors des expérimentations dans les années à venir.

Les analyses holistiques de la végétation de la vigne ont été également effectuées à l'aide de la méthode de Morpho-Chromatographie. Elle permet de confirmer qu'il y a une certaine différence entre l'état de la vigne des parcelles qui n'ont pas reçu des préparations à base d'*Equisetum arvense* et ceux qui les ont reçues. Néanmoins, il est encore trop tôt pour faire des conclusions en s'appuyant seulement sur les tests dits « holistiques » même si ceux-ci se révéleront indispensables pour élargir notre champ de vision du vivant.

Pour conclure il faut noter que la méthode de Morpho-Chromatographie montre des pistes intéressantes pour la recherche en agriculture biodynamique. Néanmoins, à ce jour on peut bien « lire » et interpréter des chromatogrammes des compostes et des sols, tandis que la lecture des images formées à partir des feuilles des plantes semble être moins évidente.

LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allègre, M. (2007) Étude du rôle des stomates dans l'interaction vigne-*Plasmopara viticola*, agent du mildiou. Thèse de doctorat à l'université de Bourgogne.
- Baars, T. (2002) Reconciling scientific approaches for organic farming research. Doctoral Dissertation, Wageningen University and Research Centre.
- Ballivet, C., Gelin, J.P. (2007) Les méthodes morphogénétiques mises en œuvre à l'Institut Kepler. Bilan sommaire et provisoire. Instit Kepler.
- Bavaresco, L. and Eibach, R. (1987) Investigations on the influence of N fertilizer on resistance to powdery mildew (*Oidium tuckeri*), downy mildew (*Plasmopara viticola*) and on phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis*: 26(4), 192-200.
- Burketová, L., Trdá, L., G. Ott, P., Valentová, O. (2015) Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances*: xxx (2015) xxx-xxx.
- Burruano, S. (2000) The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist*, 14: 4.
- Burruano, S. and Ciofalo, G. (1990) Studio della dinamica di germinazione delle oospore di *Plasmopara viticola* (Berk et Curt). *Notiziario delle Malattie delle Piante, Ser. III*, 38: 274 -286.
- Canadanovic-Brunet, J. M., Cetkovic, G. S., Djilas, S. M., Tumbas, V. T., Savatovic, S. S., Mandic, A. I., et al. (2009) Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense L.*) extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 269-278.
- Carbonneau, A. (1976) Principes et méthodes de mesure de la surface foliaire. Essai de caractérisation des types de feuilles dans le genre *Vitis*. –Ann. Amél. Plantes 26: 327-343.
- Carbonneau, A. (1995) La surface foliaire exposée potentielle. Guide pour sa mesure. *Progr. Agric. Vitic.* 112,204-212.
- Carpenter-Boggs, L., Kennedy, A.C. and Reganold J.P. (2000b) Organic and biodynamic management: effects on soil biology. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 1651- 1659.
- Carpenter-Boggs, L., Reganold, J.P. and Kennedy A.C. (2000a) Biodynamic preparations: short-term effects on crops, soils and weed populations. *American Journal of Alternative Agriculture*. 15 (3): 110-118.
- Carpenter-Boggs, L., Reganold, J.P. and Kennedy A.C. (2000c) Effects of biodynamic preparations on compost development. *Biological Agriculture and Horticulture*. 17:313-328.
- Chérif, M., Benhamou, N., Menzies, J. and Bélanger, R. (1992) Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41, 411-425.
- Chovelon, M. (2004) Lutte contre le mildiou de la vigne : évaluation d'un extrait aqueux de saule (*Salix*) contre *Plasmopara viticola*. GRAB Site Agroparc – BP 122 – 84911 Avignon Cedex. *AlterAgri*, 68.
- Chovelon, M., Bardon, A. (2011) Contrôle de *Plasmopara viticola*, agent du mildiou de la vigne. *Grab*, V 11 / Paca 02.
- Colmenares, R. and Miguel, J.M. (1999) Improving permanent pastures growth: an organic approach. *Cahiers Options Méditerranéennes*. 39: 189-191.
- Conigliaro, G. Burruano, S. Laviola, C. (1996) Visualizzazione delle strutture di *Plasmopara viticola* in tessuti non sezionati di *Vitis vinifera*. *Informatore fitopatologico*, 11: 4 -45.
- Cuevas García, E. (2001) Estudio de mecanismos de adaptación ecofisiológica de la vid (*Vitis vinifera L. cv. Tempranillo*) al déficit hídrico : evaluación del consumo de agua y de las respuestas agronómicas en diferentes regímenes hídricos. Thesis (Doctoral).

Dai, G., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D. (1995) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia*. *Physiol. And Mol. Plant Pathol.* 46, 177-188.

Datnofft, L., Elmer, W., and Huber, D. (2007) Mineral nutrition and plant disease. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Datnofft, L., Raid, N., Snyder, G. and Jones, D. (1991) Effect of calcium silicate on blast and brown spot intensities and yields of rice. *Plant Dis.* 75, 729-732.

Deffune, G and Scofield, A.M.. (1994) Effects of humic acids and three bio-dynamic preparations on the growth of wheat seedlings. In Proc. 3rd ESA Congress, Abano-Podova, Paper ref no. 3-56.

Delmas, C.E.L., Mazet, I. D., Jolivet, J., Delière, L., Delmotte, F. (2014) Simultaneous quantification of sporangia and zoospores in a biotrophic oomycete with an automatic particle analyzer: Disentangling dispersal and infection potentials. *Journal of Microbiological Methods* 107 (2014) 169–175.

Dodds, P.N, Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet*;11:539–48.

Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J. and Bélanger, R. (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 1-6.

Fritz, J. and Köpke, U. (2000) Horn silica applications in combination with plant extract. In Proceedings 13th International IFOAM Scientific Conference, Basel, Switzerland.

Gamm, M. (2011) Impact de *Plasmopara viticola* sur le métabolisme de l'amidon et le fonctionnement stomatique chez la vigne. Thèse de doctorat en Sciences de la vie.

Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. (2012) Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 21–27.

Gelin, J.P. Les méthodes morphogénétiques dites sensibles. Application aux plantes médicinales et aux vins. Dossier technique. Mouvement de l'agriculture biodynamique.

Ghanmi, G., McNallya, N., Menzies, G. and Bélanger, R. (2004) Powdery mildew of *Arabidopsis thaliana*: a pathosystem for exploring the role of silicon in plant–microbe interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64, 189-199.

Gindro, K., Godard, S., De Groote, I., Viret, O. (2007) Peut-on stimuler les mécanismes de défense de la vigne? *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 39 (6): 377-383.

Gindro, K., Pezet, R., Viret, O. (2003) Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Phys. Biochem.* 41, 846-8537.

Glazebrook, J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 43: 205-227.

Gobbin, D. (2004) Redefining *Plasmopara viticola* epidemiological cycle by molecular genetics. Diss. ETH No. 15385.

Gobbin, D., Jermini, M., Loskill, B., Pertot, I., R aynal, M., Gessler, C. (2005) Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. *Plant Pathology*, 54: 522-534.

Gobbin, D., Rumbou, A., Linde, C.C., Gessler, C. (2006) Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards

Goldstein, W. (1986) Alternative crops, rotations and management systems for the Palouse. PhD. Dissertation. Dept. of Agronomy and Soils, Washington State University, Pullman.

Grenville-Briggs, L.J. and Van West, P. (2005) The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. *Advances in Applied Microbiology* 57: 217-243.

Grenville-Briggs, L.J. and Van West, P. (2005) The biotrophic stages of oomycete-plant infections. *Advances in Applied Microbiology* 57:2017-243.

Hebrard, O., Douzals, J-P., Ruelle, B., De Rudnicki, V., Bonicel, J-F, Codis, S., Montegano, P., Verges, A., Davy, A., Raynal, M. (2013) L'optimisation des doses permise par la précision d'application du pulvérisateur en vignes étroites. *Compte-rendu de 7 années d'expérimentation*. Institut Français de la Vigne et du Vin, IRSTEA Montpellier. Lettre actualités n° 64.

Hill, G., Breth, K., Scholl, H., Spies, S. and Cortesi, P. (1997) Examination of different methods for their reliability in predicting the date of *Plasmopara viticola* primary infection in Rheinessen. – *Spec-rep-N-Y-State-Agric-Exp-Stn*. Geneva: New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University (68): 49-53.

Hunter, J.J. (1998) Plant Spacing Implications for Grafted Grapevine II. Soil Water, Plant Water Relations, Canopy Physiology, Vegetative and Reproductive Characteristics, Grape Composition, Wine Quality and Labour Requirements. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19(2),35-51.

Inanaga, S., Okasaka, A. and Tanaka, S. (1995) Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.* 11, 111-117.

Jeandet, P., Douillet-Breuil, A., Bessis, R., Derbord, S., Sbaghi, M., Adrian, M. (2002) Phytoalexins from *Vitaceae*: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism, *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731-2741.

Jermine, M., Gobbin, D., Blaise, P., Gessler, C. (2003) Influence of the overwintering methods on the germination dynamic of downy mildew (*Plasmopara viticola*) oospores – *IOBC/wprs Bulletin* 26(8): 37-41.

Kaltoft, P. (1999) Values about Nature in Organic Farming Practice and Knowledge, *Sociologia Ruralis*, Volume 39, Issue 1, 39–53.

Kamoun, S. (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41-60.

Koepf, H.H. (1993) *Research in Biodynamic Agriculture: Methods and Results*. Bio-Dynamic Farming and Gardening Association, Inc., Kimberton, Pennsylvania.

König, U. J. (2000) Optimization of biodynamic preparations: oak bark preparation. In *Proceedings 13th International IFOAM Scientific Conference*, Basel, Switzerland.

Kutner, M.H., Nachtseim CJ, Neter J, Li W. (2005) *Applied Linear Statistical Models*. Fifth Edition. New York: McGraw-Hill/Irwin.

Labun, P., Grulova, D., Salamon, I., Sersen, F. (2013) Calculating the Silicon in Horsetail (*Equisetum arvense L.*) during the Vegetation Season. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 510-514.

La Torre, A., Mandala, C., Caradonia, F., Battaglia, V. (2012) Natural alternatives to copper and low-rate copper formulations to control grape downy mildew in organic farming, *Hellenic Plant Protection Journal* 5:13-21.

Lannou, C. (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 319–338.

Lapin, D., and Van den Ackerveken, G. (2013) Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity, *Trends in Plant Science*, October 2013, Vol. 18, No. 10

Le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., Chong, J. (2009) Characterisation of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol.* 9, 54.

Leeuwen, C., et Friant, P. (2011). Les méthodes d'estimation de l'alimentation azotée de la vigne et des raisins au vignoble : état de l'art. Colloque IFV Sud-Ouest-Toulouse.

Lepetit, A. (2014) 35 questions sur la biodynamie à l'usage des amateurs de vin. 2e éditions, Sang de la Terre.

Lorand, A.C. (1996) Biodynamic Agriculture: A Paradigmatic Analysis. The Pennsylvania State University, Department of Agricultural and Extension Education. PhD Dissertation. 114 p.

Madden, L.V. (1997) Effects of rain on splash dispersal of fungal pathogens. Canadian Journal of Plant Pathology, Vol.19, p.225-230

Mäder, P., Edenhofer, S., Boller, T., Wiemken, A., Niggli, U. (2000) *Arbuscular mycorrhizae* in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. Biol. Fertil. Soils 31:150-156.

Mäder, P., Fleissbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. and Niggli U. (2002) Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. Science 296:1694-1697.

Marchand, P.A., Isambert, C.A., Jonis, M., Parveaud, C.-E., Chovelon, M., Gomez, C., Lambion, J., Ondet, S.J., Aveline, N., Molot, B., Berthier, C., Furet, A., Clerc, F., Rey, A., Navarro, J-F., Bidault, F., Maille, E., Bertrand, C., Andreu, V., Treuvey, N., Pierre, S. P., Coulon, A., Chaput, C., Arufat, A., Brunet, J.-L., Belzunces, L., Bonafos, R., Guillet, B., Conseil, M., Tournant, L., Oste, S., Larrieu, J.-F. (2014) Évaluation des caractéristiques et de l'intérêt agronomique de préparations simples de plantes, pour des productions fruitières, légumières et viticoles économes en intrants. Innovations Agronomiques 34, 83-96.

McInerney, J. (2002) Body and soil: biodynamic practices restore the vineyard and yield richly complex wines. House and Garden. 74 (1):60-62.

Meißner G. (2013) Viticulture bio-dynamique. Journées Techniques Légumes & Cultures pérennes Biologiques, p. 42-45.

Menzies, J., Ehret, D., Glass, A. and Samuels, A. (1991a) The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 39, 403-414.

Menzies, J., Ehret, D., Glass, A., Helmer, T., Koch, T. and Seywerd F. (1991b) Effects of soluble silicon on the parasitic fitness of *Sphaerotheca fuliginea* on *Cucumis sativus*. Phytopathol. 81, 84-88.

Meunier, M. (2001) Biodynamic wine and its progress in different countries. The Australian Grapegrower and Winemaker. 444:77-78.

Milanovic, V., Radulovic, N., Todorovic, Z., Stankovic, M., & Stojanovic, G. (2007) Antioxidant antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five serbian *Equisetum species*. Plant Food Human Nutrition, 62, 113-119.

Murisier, F. (1996) Optimisation du rapport feuille-fruit de la vigne pour favoriser la qualité du raisin et l'accumulation des glucides de réserves. Relation entre le rendement et la chlorose. Thèse N° 11729, EPFZ Zurich, 134 p.

Nagai, T., Myoda, T., Nagashima, T. (2005) Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. FoodChem. 91, 389-394.

Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol. Rev. 198, 249-266.

OEPP PP 1/31(3) Evaluation biologique des fongicides. Plasmopara viticola.

Park, E., Seem, R. (1997) DMCAST: a prediction model for grape downy mildew development. Viticultural and Enological Sciences. Vol.52, p.182-189.

Parpinello, G.P., Rombolà, A.D., Simoni, M., Versari, A. (2015) Chemical and sensory characterisation of Sangiovese red wines: Comparison between biodynamic and organic management, *Food Chemistry* 167, 145–152.

Pattnaik, S., Subramanyan, V. R., Bapaji, M., and Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89, 39e46.

Pertot, I., Gobbin, D. and Gessler, C. (2003) Occurrence of *Plasmopara viticola* primary and secondary infections in the early stage of the season in Northern Italy (Trentino). – *IOBC/wprs Bulletin* 26 (8): 47-50.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H. (2004) Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43, 145-148.

Pfeiffer, E.E. (1984) Chromatography applied to quality testing. *Bio-Dynamic literature*, Wyoming, RI02898.

Pretty J.N. (1995) Regenerating agriculture; policies and practice for sustainability and self-reliance. Earthscan Publications Ltd, London, United Kingdom.

Protocole Fredon (2004). Protocole d'étude. Suivre de la germination des œufs d'hiver de mildiou.

Radulovic, N., Stojanovic, G., and Palic, R. (2006). Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L, essential oil. *Phytotherapy Research*, 20, 85e88.

Raupp, J. (2001) Manure fertilization for soil organic matter maintenance and its effects upon crops and the environment, evaluated in a long-term trial. In *Sustainable Management of Soil Organic Matter*. Rees, R.M., B. C. Ball, D. C. Campbell, and C.A. Watson (Eds.), pp. 301-308. CAB International.

Reeve, J. R., Carpenter-Boggs, L., Reganold, J. P., York, A. L., McGourty, G., and McCloskey, L. P. (2005) Soil and winegrape quality in biodynamically and organically managed vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(4), 367–376.

Reeve, J.R. (2003) Effects of biodynamic preparations on soil, winegrape, and compost quality on a California vineyard. Master of Science. Washington State University. Department of Crop and Soil Sciences.

Renella, G., Chaudri, A. M., Brookes, P. C. (2002) Fresh additions of heavy metals do not model long-term effects on microbial biomass and activity. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 121-124.

Reveret, J.P., Peltier, J., Boudier, H. (1981) De l'agriculture conventionnelle à l'agriculture écologique, vers un nouveau paradigme, *Sociologie et sociétés*, vol. 13, n° 1, p. 49-62 URI: <http://id.erudit.org/iderudit/001631ar>

Robert-Seilaniantz, A, Grant, M, Jones, J.D. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol*;49: 317–43.

Rodrigues, F., McNally, D., Datnoff, L., Jones, J., Labbé, C., Benhamou, N., Menzies, J. and Bélanger, R. (2004) Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathol.* 94, 177-183.

Romero, A., Munévar, F., Cayón, G. (2011) Silicon and plant diseases. A review, *Agronomía Colombiana* 29(3), 473-480.

Rossi, V. and Caffi, T. (2007) Effect of water on germination of *Plasmopara viticola* oospores. *Plant pathology* 56(6): 957-966.

Rossi, V., Caffi, T. (2012) The role of rain in dispersal of the primary inoculum of *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, Vol.102, p.158-165.

Rossi, V., Caffi, T., Giosue, S., Girometta, B., Bugiani, R., Spanna, F., Dellavalle, D., Brunelli, A., Collina, M. (2005) Elaboration and validation of a dynamic model for primary infections of *Plasmopara viticola* in North Italy. *Rivista Italiana di Agrometeorologia*. Vol.3, p.7-13.

Rossi, V., Giosue, S., Caffi, T. (2009) Modelling the dynamics of infections caused by sexual and asexual spores during *Plasmopara viticola* epidemics. Journal of Plant Pathology. Vol. 91, n°3, p.615-627.

Rust, A. (1996) Le test Chroma. Un protocole d'analyse des sols et des composts. Chambre d'agriculture GARD.

Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H., Hunt M.D. (1996) Systemic acquired resistance. Plant Cell 8, 1809-1819.

Schneider S. and W.-R. Ulrich (1992) Induzierte Resistenz gegen Pflanzenkrankheiten. Lebendige Erde. 1:19-24.

Schultz, H.R. (1989) CO₂-Gaswechsel und Wassertransport von Stark- und Schwachlichttrieben bei *Vitis vinifera* L. (cv. Riesling) in Abhängigkeit von Klima- und Pflanzenfaktoren - Ansatz eines Empirischen Assimilations modells- Geisenheimer Berichte, Band 5, p.221.

Smart R. Et Robinson M. (1991) Sunlight into wine. A handbook for winegrape canopy management. Winetitles Eds, Adelaide, 88 p

Smart, R.E., Dick, J.K., Gravett, I.M., Ficher, B.M. (1990) Canopy management to improve grape yield and wine quality. Principles and practices. South African j. Enol.Viti., 11, 3-17.

Smart, R.E. (1988) Shoot spacing and canopy light microclimate. Am.J. Enol. Vitic. 39(4), 325-333.

Spring J.-L. (1999) Indice chlorophyllien du feuillage et nutrition azotée du cépage Chasselas. Premières expériences en Suisse romande. Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic. 31(3), 141-145.

Spring J.-L. and Zufferey V. (2000) Intérêt de la détermination de l'indice chlorophyllien du feuillage en viticulture. Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic. 32(6), 323-328.

Steiner, R. (1924) Le cours aux agriculteurs.

Taupier-Létage, B. (2009) Méthodes Globales d'Analyse de la Qualité. Etat des connaissances. ITAB .

Tregouat, O., Ollat, N., Grenier, G. Et Van Leeuwen, C. (2001) Etude comparative de la précision et de la rapidité de mise en œuvre de différentes méthodes d'estimation de la surface foliaire de la vigne. J. Int. Sci. Vigne Vin, 35, n°1, 31-39.

Valdes Gomez, H. (2007) Relations entre états de croissance de la vigne et maladies cryptogamiques sous différentes modalités d'entretien du sol en région méditerranéenne. THESE (BSIAE).

Valdes, H., Celette, F., Fermaud, M., Cartolaro, P., Clerjeau, M., Gary, C. (2005) Comment évaluer l'influence de la vigueur sur la sensibilité de la vigne aux maladies cryptogamiques, Progrès agricole et Viticole, 2006, 123, 12.

Volk, R., Kahn, R. and Weintraub, R.. (1958) Silicon content of the rice plant as a factor influencing its resistance to infection by the rice blast fungus, *Picularia oryzae*. Phytopathol. 48, 179-184.

Williams, L.E., Ayars J.E. (2005) Grapevine water use and the crop coefficient are linear functions of the shaded area measured beneath the canopy. Agricultural and Forest Meteorology 132(3), 201-211.

Yoshida, S., Ohnishi, Y. and Kitagishi, K. (1962a) Histochemistry of silicon in rice plant II. Soil Sci. Plant Nutr. 8(2), 36-41.

Zufferey, V.J.-U. (2000) Echanges gazeux des feuilles chez *Vitis vinifera* L.(cv. Chasselas) en fonction des paramètres climatiques et physiologiques et des modes de conduite de la vigne. Ecole Polytechnique Fédérale de Zurich. Thèse EPFZ N°13777.

ANNEXES

I. Résultats des recherches portant sur l'agriculture biodynamique

Une étude de 21 ans, comparant des systèmes biodynamiques, biologiques, intégrés, et conventionnels a montré non seulement une activité biologique plus élevée dans les parcelles biodynamiques, mais a aussi suggéré que le système biodynamique pourrait être plus efficace, puisque la diversité microbienne plus élevée a été corrélée avec une respiration du sol plus basse (Mäder *et al.*, 2000, 2002).

Les résultats d'une seconde étude à long terme (Raupp, 2001) ont montré qu'il y avait une diminution du carbone organique du sol sous la gestion conventionnelle et sous la gestion biologique (dans une moindre mesure); seules les parcelles en biodynamie ont conservé leurs niveaux originaux de carbone organique. Une étude de quatre ans, menée en Allemagne, a révélé que la quantité de matière organique, d'azote total, de biomasse microbienne, d'activité de déshydrogénase et de déshydrogénase par unité de biomasse microbienne ont été significativement plus élevées dans les parcelles qui ont reçu les traitements biodynamiques, comparé à ceux avec une gestion biologique et conventionnelle (Abel, 1987, as translated by Koepf, 1993, cité par Reeve *et al.*, 2005). De même, Goldstein (1986) a démontré que les préparations biodynamiques influencent positivement les propriétés biologiques du sol et la croissance des racines des plantes. Colmenares et Miguel (1999) ont constaté que les préparations biodynamiques, pulvérisées sur des prairies permanentes en Espagne pendant plus de 3,5 ans, ont augmenté la teneur en matière sèche des prairies, en l'absence de toute fertilisation.

En outre, Carpenter-Boggs *et al.* (2000c) ont constaté que les préparations biodynamiques ont eu des effets significatifs sur le développement de compost. La préparation de silice de corne 501 a été démontré comme induisant une résistance systémique contre les agents pathogènes dans le concombre (Schneider et Ullrich 1992, cité par Reeve *et al.*, 2005). Fritz and Köpke (2000) ont découvert que la préparation silice de corne 501 augmente significativement la croissance des haricots verts, appliquée seule ou avec des extraits des plantes. König (2000) a montré que la préparation de l'écorce de chêne 506 réduit de manière significative l'infection des courgettes par le mildiou. Deffune et Scofield (1994) ont montré que les préparations biodynamiques à une concentration de 10^{-25} stimulent la croissance des semis de blé. En revanche les études de Carpenter-Boggs *et al.* (2000a and 2000b) n'ont pas montrées d'effets des préparations biodynamiques.

En ce qui concerne les vins biodynamiques, ceux-ci ont reçu une reconnaissance internationale considérable ces dernières années puisque de nombreux vignobles mondialement connus adoptent les pratiques évoquées par Rudolf Steiner en 1924 (Reeve *et al.*, 2005). Une étude menée en 1996 (Reeve *et al.*, 2005) sur des vignes en bio et biodynamie a montré qu'au bout de six ans il n'y a pas de différence significative sur la qualité du sol entre ces deux modalités. Cependant un essai complémentaire sur les vers de terre a mis en évidence qu'il y avait significativement plus de vers de terre sur des parcelles en biodynamie. Les analyses du raisin ont également montrées que les traitements biodynamiques ont eu un effet significatif sur les quantités plus élevées des tanins (en 2002 et Brix en 2003). En outre, de phénols totaux et les anthocyanes totaux étaient significativement plus élevés (Reeve *et al.*, 2005).