

## Évaluation des caractéristiques et de l'intérêt agronomique de préparations simples de plantes, pour des productions fruitières, légumières et viticoles économes en intrants

Marchand P.A.<sup>1</sup>, Isambert C.A.<sup>1</sup>, Jonis M.<sup>1</sup>, Parveaud C.-E.<sup>2,1</sup>, Chovelon M.<sup>2,1</sup>, Gomez C.<sup>2</sup>, Lambion J.<sup>2</sup>, Ondet S.J.<sup>2</sup>, Aveline N.<sup>3</sup>, Molot B.<sup>3</sup>, Berthier C.<sup>3</sup>, Furet A.<sup>4</sup>, Clerc F.<sup>4</sup>, Rey A.<sup>4</sup>, Navarro J.-F.<sup>4</sup>, Bidault F.<sup>5</sup>, Maille E.<sup>6</sup>, Bertrand C.<sup>7</sup>, Andreu V.<sup>7</sup>, Treuvev N.<sup>8</sup>, Pierre S. P.<sup>8</sup>, Coulon A.<sup>9</sup>, Chaput C.<sup>9</sup>, Arufat A.<sup>10</sup>, Brunet J.-L.<sup>11</sup>, Belzunces L.<sup>11</sup>, Bonafos R.<sup>12</sup>, Guillet B.<sup>12</sup>, Conseil M.<sup>13</sup>, Tournant L.<sup>14</sup>, Oste S.<sup>14</sup>, Larrieu J.-F.<sup>15</sup>

<sup>1</sup> ITAB, Institut Technique de l'Agriculture Biologique ; 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12

<sup>2</sup> GRAB, Groupe de Recherche en Agriculture Biologique ; Maison de la Bio, 255 chemin de la Castelette, BP 11283, 84911 Avignon Cedex 9

<sup>3</sup> IFV, Institut Français de la Vigne et du vin ; Domaine de l'Espiguette, 30240 Le Grau du Roi

<sup>4</sup> ADABio, Association pour le Développement de l'Agriculture Biologique ; Maison des Agriculteurs, 40 avenue Marcelin Berthelot, BP 2608, 38000 Grenoble Cedex 2

<sup>5</sup> Chambre d'Agriculture de Saône et Loire, CA71, Service du Vin ; 59 rue du 19 mars 1962, 71010 Macon Cedex

<sup>6</sup> AGROBIO, Périgord ; 20, rue du Vélodrome, 24000 Périgueux

<sup>7</sup> LCBE UPVD, Université de Perpignan Via Domitia ; 52 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan

<sup>8</sup> SERAIL, Station d'expérimentation Rhône-Alpes et d'Information Légumes / CTIFL ; Les Hôteaux, 123, chemin du Finday, 69126 Brindas

<sup>9</sup> Chambre d'Agriculture Interdépartementale d'Ile-de-France, 2 avenue Jeanne d'Arc, 78150 Le Chesnay

<sup>10</sup> CIVAMBio66, Pyrénées Orientales ; 19 avenue de Grande Bretagne, 66025 Perpignan Cedex

<sup>11</sup> INRA Avignon (UMR 0406 UAPV) ; Domaine St-Paul, site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9

<sup>12</sup> INRA SupAgro (Montpellier) ; 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 02

<sup>13</sup> IBB, Initiative Bio Bretagne / P.A.I.S. ; 33 avenue Winston Churchill, BP 71612, 35016 Rennes Cedex

<sup>14</sup> FREDON NPDC, Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles Nord-Pas de Calais ; 265 rue Becquerel, BP 74, 62750 Loos-en-Gohelle

<sup>15</sup> Chambre d'Agriculture du Tarn-et-Garonne, CA82 ; 130 avenue Marcel Unal, 82017 Montauban Cedex

Correspondance : [patrice.marchand@itab.asso.fr](mailto:patrice.marchand@itab.asso.fr)

### Résumé

Ce projet 4P « Protection des Plantes Par les Plantes » porte sur la recherche d'alternatives à l'utilisation de pesticides en s'appuyant sur l'évaluation de préparations à base de plantes (infusions, décoctions de prêle, armoise, absinthe et saule) dans un objectif de protection des plantes (bio-agresseurs en arboriculture, maraîchage et viticulture). Le 4P se focalise sur l'étude des propriétés fongistatiques ou fongicides, la composition chimique et l'écotoxicité de ces extraits. L'étude des efficacités s'appuie sur des expérimentations de terrain réalisées sur un réseau de parcelles. Ce programme pluridisciplinaire s'inscrit également dans le contexte de la parution du cadre réglementaire pour les Préparations Naturelles Peu Préoccupantes, et l'effort sur le Bio-contrôle. Les résultats sont encourageants, et bien que morcelés et partiels, ils sont en cours de valorisation effective. Il a pu mettre en évidence l'intérêt de ces préparations, définir les usages les plus caractéristiques (Bonnes Pratiques Agricoles), en particulier en viticulture dans la réduction des doses de cuivre et en arboriculture pour la réduction des doses de soufre.

**Mots-clés** : extraits de plantes, prêle *Equisetum arvense*, saule blanc *Salix alba*, armoise *Artemisia vulgaris*, absinthe *Artemisia absinthium*, menthe poivrée *Mentha piperita*, décoction, extraits hydro alcooliques, activité antifongique, mildiou, oïdium, tavelure et cloque.

## **Abstract: Evaluation of characteristics and agronomic interest of simple herbal preparations for protection of, fruit, vegetable and grape, production**

This 4P project "Plant Protection From Plants" focuses on the search for alternatives to the use of pesticides based on the evaluation of herbal preparations (infusions, decoctions) with the objective of protection of plants against pests. 4P project focuses on the study of horsetail, wormwood, absinth and white willow for their fungifuge or fungicide capacities. Aspects concerning the chemical composition and ecotoxicity, research have been conducted in laboratory. The efficiency studies were based on field experiments conducted on a network of plots. This multidisciplinary program involved production of fruits and vegetables, and viticulture areas where protection issues are of particular concern. It also fits in the context of the publication of a regulatory framework for harmless natural preparations, and discussions under the EC Directive n° 128/2009 for the implementation of these new practices as integrative parts of the Bio Control Agents development. We were able to demonstrate the value of these preparations, define the most typical uses (Good Agricultural Practices), in particular to reduce doses in vineyards (copper) and orchards (sulfur).

**Keywords:** plant extract, horsetail *Equisetum arvense*, common wormwood *Artemisia vulgaris*, absinth *Artemisia absinthium*, white willow *Salix alba*, mint *Mentha piperita*, water decoction, hydro-alcoholic extracts, antifungal activity, mildew, oidium, scab disease.

## **Introduction**

Ce projet portait sur la recherche d'alternatives à l'utilisation de pesticides en s'appuyant sur l'évaluation de préparations à base de plantes (infusions, décoctions issues d'au moins cinq plantes différentes) dans un objectif de protection des plantes contre les bio-agresseurs. S'appuyant sur les pratiques et les observations empiriques des agriculteurs qui utilisent ce type de préparations et sur les quelques travaux réalisés dans ce domaine (Bertrand B, 2003 ; Bertrand C, 2008 ; Hsieh T F, 2005 ; Lagow B, 2004 ; La Torre A, 2004&2008 ; Milovanovic V, 2007 ; Petiot E, 2008 ; Villar Morales C, 1990), ce projet s'est organisé autour de deux grands objectifs :

- améliorer les connaissances sur les propriétés et les modes d'action de ces préparations végétales (efficacité, composition, toxicité...) ;
- optimiser leur utilisation (dosage, durée de conservation, conditions d'applications...).

Le projet a reposé sur un partenariat entre l'ITAB, les stations expérimentales des instituts techniques agricoles (ITA) et des laboratoires de recherche (Université, INRA). Ce programme pluridisciplinaire concerne les productions de fruits et légumes et la viticulture, domaines pour lesquels les questions de protection sont particulièrement préoccupantes, principalement en Agriculture Biologique. Il s'inscrivait également dans le contexte de la parution d'un cadre réglementaire national pour les Préparations Naturelles Peu Préoccupantes (PNPP), et des discussions dans le cadre du plan EcoPhyto 2018 (réduction des pesticides chimiques de 50%). Aujourd'hui, un certain nombre d'agriculteurs biologiques mais également conventionnels utilisent de façon plus ou moins empirique des préparations simples de plantes (infusions, décoctions, macérations), avec comme objectif de conférer aux plantes cultivées une meilleure résistance aux attaques des bio-agresseurs et/ou de réduire les traitements phytopharmaceutiques (nombre, fréquence, doses...). Les connaissances scientifiques concernant le mode préparatoire de ces produits et leurs modalités d'utilisation étaient rares et partielles mais sont en augmentation régulière.

Or, pour que ces préparations puissent être utilisées avec une efficacité reproductible, il est primordial de comprendre même partiellement- leur mode d'action de façon à pouvoir optimiser l'extraction des substances actives, le processus de fabrication, la stabilisation de ces préparations, les dates et les

doses d'application, afin de protéger qualitativement et quantitativement les cultures de façon satisfaisante.

En effet, la mise en place de programmes de protection des plantes, intégrant largement ces préparations naturelles, ne doit pas se faire au détriment des rendements ni en hypothéquant les capacités de l'outil de production.

La « rationalisation » de l'usage de ces produits doit permettre de répondre à l'une des demandes sociétales majeures de notre époque, à savoir la production d'aliments sains, non seulement pour les consommateurs (pas de résidus de pesticides) mais également pour l'environnement (pas de pollution des eaux et des sols, respect des équilibres naturels) et les utilisateurs (risques moindres voire nuls pour la santé de l'agriculteur qui utilise ces produits).

Un autre enjeu de ces produits est de parvenir à protéger les cultures avec une utilisation minimale d'intrants énergétiquement et écologiquement coûteux, dans une perspective, certes lointaine mais inéluctable, de la réduction des réserves pétrolières. Il importe alors d'anticiper et de mettre en place de nouveaux systèmes de protection des plantes répondant aux enjeux à la fois sociétaux et économiques de notre siècle.

Une meilleure connaissance de ces préparations devait également permettre de réduire le nombre et/ou les doses des traitements phytopharmaceutiques -dont les toxicités ne sont pas anodines pour les utilisateurs, les consommateurs ou l'environnement- tout en maintenant les niveaux de production (en qualité et en quantité) et en assurant une protection satisfaisante des cultures, des stratégies de protection plus respectueuses de l'environnement et capables ainsi de répondre aux enjeux agro-environnementaux du plan Ecophyto 2018.

Les objectifs détaillés poursuivis dans ce projet étaient de :

1. montrer des efficacités *in vitro* ;
2. caractériser les extraits (approfondir les connaissances sur la composition, l'efficacité et les modalités d'application de préparations de plantes) ;
3. tester l'innocuité des préparations, effectuer une première approche des risques de toxicité sur les organismes non cibles (organismes aquatiques, abeilles) ;
4. tester l'efficacité sur plantes en pots ;
5. tester l'efficacité en plein champ et si possible rendre reproductible l'efficacité de ces préparations (expérimentations de terrain réalisées sur un réseau de parcelles) ;
6. fournir aux agriculteurs des références scientifiques leur permettant d'améliorer leurs pratiques quant à l'usage de ces produits.

## 1. Matériel et méthodes

Cinq plantes ont été retenues dans le 4P (suite à une enquête multi-filières) : la prêle (*Equisetum arvense*), le saule blanc (*Salix alba*), l'armoise (*Artemisia vulgaris*), la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et l'absinthe (*Artemisia absinthium*). Les préparations à base de plantes ont été testées sous forme de décoctions, de tisanes et aussi d'extraits hydro-alcooliques, plus pratiques, calibrés et stables.

### 1.1 Les extraits de plantes

Toutes les préparations naturelles utilisées lors de ce projet ont été réalisées par les expérimentateurs selon une recette commune, et à partir de plantes sèches issues des mêmes lots et des mêmes fournisseurs (commandes collectives). C'est une préparation sous forme de tisane (les plantes séchées sont mises à infuser dans le l'eau bouillante pendant un temps donné), qui a été adoptée pour la première année.

Nom commun	Nom latin	Partie de la plante	Essais		Données
Armoise commune	<i>Artemisia vulgaris</i>	Feuilles et fleurs	PC	A	Sur 3 ans
Menthe poivrée	<i>Mentha piperita</i>	Feuilles	-	A	Uniquement en 2010
Prêle des champs	<i>Equisetum arvense</i>	Feuilles	PC	A	Sur 3 ans
Saule blanc	<i>Salix alba</i>	Feuilles	PC	A	Sur 3 ans
		Ecorces	-	A	Uniquement en laboratoire
Absinthe	<i>Artemisia absinthium</i>	Feuilles	PC	A	Utilisée en 2011-12

**Tableau 1** : Plantes testées dans le cadre du projet ; A = auxiliaires, PC = plein champ,

### 1.2 Les extraits hydro-alcooliques de plantes

Les préparations naturelles de plantes ont été produites par les expérimentateurs sous forme de tisanes en 2010. En 2011-12, les préparations utilisées ont été réalisées selon une recette commune plus stable (extraction hydro-alcoolique 160-280 mg/L), et à partir de plantes sèches issues des mêmes lots et du même fournisseur. Les lots de plantes ont ensuite été évalués par l'Université de Perpignan qui a fait part aux partenaires de l'expérimentation du dosage de préparation-mère à utiliser pour procéder aux pulvérisations au champ (équivalent d'un gramme (1g) de matière sèche par litre de préparation au champ). Ce type de préparation présente l'avantage d'avoir théoriquement des concentrations plus élevées en métabolites secondaires (*a priori* les composés responsables de l'activité élicitrice et/ou directe des préparations), elle réduit la difficulté pour les expérimentateurs de préparer leurs infusions et permet d'avoir des solutions identiques pour tous (pas de variations possibles dans les recettes).

## 2. Les essais

### 2.1 Les tests en laboratoire

Cet axe était consacré aux travaux de recherche en laboratoire, à savoir ceux réalisés par les organismes de recherche publique (SupAgro Montpellier et Université Perpignan). Cet axe comprenait deux parties : une étude en laboratoire des activités biologiques des extraits hydro-alcooliques et une étude toxicologique sur abeilles et phytoseïdes (acariens prédateurs). Une série de tests *in vitro* ont été réalisés en complément des actions de terrain initialement prévues. Les résultats ont été ajoutés intentionnellement aux actions de cet axe même si l'approche est intermédiaire entre essais sur le terrain et essais en laboratoire.

#### 2.1.1. Les auxiliaires.

Des mesures de toxicité aiguë sur abeilles ont été réalisées par l'INRA d'Avignon (EPPO, 2000; Fiedler L, 1987). Une autre évaluation en tour de Potter, des effets toxicologiques des extraits éthanoliques a également eu lieu sur *Typhlodromus pyri*, acarien prédateur présent dans les vignes et les vergers afin d'évaluer les effets indirects des extraits sur la fécondité des femelles et de leur descendance.

Des notations et comptages ont eu lieu, permettant de déterminer pour chacune des plantes (armoïse, menthe poivrée, prêle et saule) un niveau de mortalité induit pour les typhlodromes. Ces évaluations de toxicité directe ont été effectuées par le laboratoire de SupAgro Montpellier à partir de la méthode CEB N°167 (Kreiter et Sentenac, 2004).

#### 2.1.2. Les tests *in vitro*.

Une série de tests *in vitro* a également été mise en place pour la première fois par l'IFV sur mildiou de la vigne en complément des essais d'efficacité au vignoble. Trois types de tests ont ainsi été effectués sur feuilles détachées ou disques foliaires, provenant du vignoble aquitain de l'IFV : anti-germinatif, curatif et préventif.

Les activités biologiques des extraits de plantes ont été testées en laboratoire. Tout d'abord l'activité antifongique testée sur différentes espèces de champignons phytopathogènes (*Penicillium expansum* et

*Botrytis cinerea*), agents de la pourriture de nombreux fruits et légumes et également présents sur vigne ; et parallèlement, l'activité antibactérienne d'une souche pathogène de nombreux fruits et légumes, *Pectobacterium atrosepticum* ou *Pectobacterium carotovorum* ssp *atrosepticum* responsable de la pourriture molle. Une série de tests *in vitro* de mobilisation (stimulation) des défenses des plantes a été réalisée par le CESN (Centre d'étude des Substances Naturelles), pour déterminer la possible action élicitrice des préparations.

Enfin, l'étude toxicologique des cinq préparations hydro-alcooliques par l'Université de Perpignan a concerné plusieurs modèles biologiques d'invertébrés aquatiques, aériens et prédateurs naturels des ravageurs. Pour les organismes aquatiques, deux modèles ont été utilisés : l'artémie *Artemia salina* et la daphnie *Daphnia pulex*.

### **2.1.3. Les analyses des extraits.**

L'étude en laboratoire de l'activité des extraits hydro-alcooliques comprend une série de tests de caractérisation des composés actifs par chromatographie. Ces profils chromatographiques HPLC-DAD-DEDL permettent d'obtenir des informations pour aider à la caractérisation des différentes classes de composés polyphénoliques et pour comprendre les activités de chaque extrait végétal.

L'autre partie de l'étude en laboratoire concerne la stabilité dans le temps des extraits de plantes. Une étude cinétique de la photodégradation des composés a été menée. Des prélèvements ont eu lieu pendant 8h toutes les deux heures afin de caractériser l'évolution des concentrations en polyphénols totaux dans les extraits de plantes soumis à un éclairage (indice UV 4). Une étude de l'activité antioxydante des extraits a également été menée par dosage colorimétrique.

## ***2.2 Les essais en pots en viticulture***

L'efficacité des produits alternatifs a été testée au Grab dans des dispositifs en bloc à quatre répétitions dans des vignobles français, de 2010 à 2012, sur des vignes en pot sous ombrière.

## ***2.3 Les essais en plein champ***

Les essais ont révélé de grandes lacunes en phytothérapie à application agricole, une méconnaissance des plantes et de leur niveau d'efficacité.

### **2.3.1. En viticulture.**

Ces travaux ont été conduits sur trois années d'essai, le but était la maîtrise du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*, Pv.), notamment en agriculture biologique. Les essais ont été effectués en association avec une faible dose de cuivre, une comparaison à une référence cuivre régionale (400 à 600 g de cuivre métal par hectare), un témoin non traité et modalité faible dose de cuivre (150 g de cuivre métal par hectare) : la fréquence et l'intensité d'attaque du mildiou sur feuilles et sur grappes ont été mesurées.

### **2.3.2. En arboriculture (pêchers, pommiers, poiriers).**

L'objectif était la protection des arbres fruitiers et la recherche d'alternatives à l'utilisation du cuivre et du soufre.

### **2.2.1. En maraîchage (laitue).**

Le phytopathogène le plus redouté sur salade, notamment en AB, est le mildiou (*Bremia*), les dégâts pouvant être très importants, parfois dès la pépinière ; deux facteurs principaux expliquent ce problème: le contournement récurrent des résistances génétiques par de nouvelles souches pathogènes (28 races déterminées), et la faiblesse des méthodes de lutte biologique possibles.

### 3. Résultats

#### 3.1 Les tests en laboratoire

##### 3.1.1. Sur les auxiliaires.

###### Les essais sur abeilles

Les résultats obtenus (INRA Avignon) avec la prêle, l'armoise et le saule, montrent que la surmortalité à 4 jours pour les abeilles ne dépasse jamais les 4% ; avec la menthe, la surmortalité atteint 12,6% à la dose D 8/10. Bien que la toxicité des préparations ne soit pas élevée, différents profils de toxicité peuvent être observés : une absence de relation dose-mortalité cohérente avec l'armoise, une courbe dose-mortalité en cloche pour la menthe et le saule, et une courbe cloche triphasique avec la prêle. Ainsi, pour la menthe, le saule et la prêle, la toxicité est plus élevée à la dose D 8/10 qu'aux doses plus élevées D et 2D. Les résultats obtenus montrent une faible toxicité sur abeille des infusions d'armoise, de menthe, de prêle et de saule, même lorsque celles-ci sont utilisées à la dose double (Figure 1).

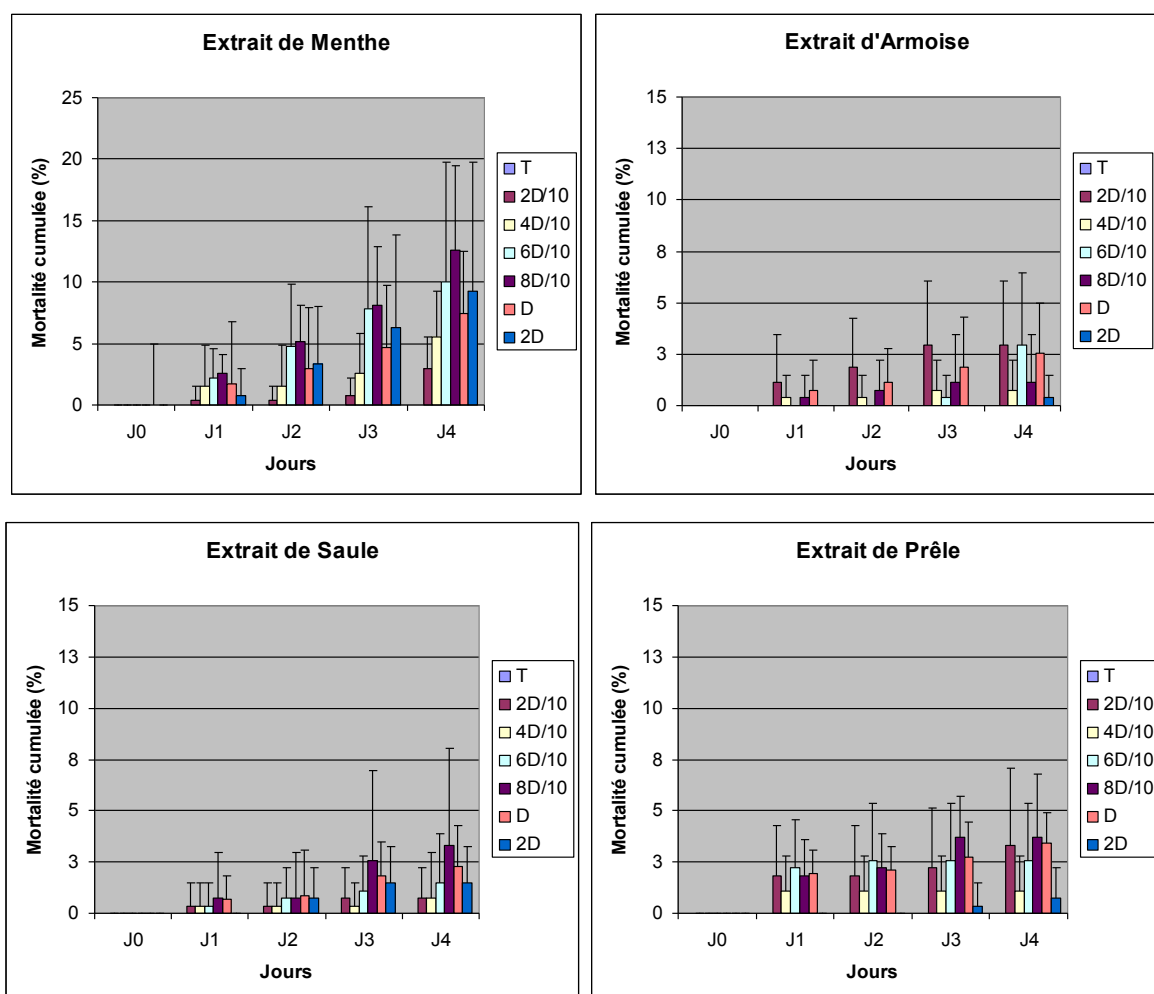


Figure 1 : Toxicité des préparations de plantes pour les abeilles.

##### Résultats en laboratoire (INRA Supagro)

Parmi les différents extraits végétaux testés, seule l'écorce de saule ne présente pas de toxicité sur abeilles aux doses (D) utilisées en plein champ que ce soit par contact ou par ingestion. Les feuilles de saule présentent une toxicité qui est fortement en relation avec la dose utilisée tandis que les profils toxicologiques de l'armoise et de l'absinthe montrent une mortalité des abeilles qui dépend plus du temps d'exposition que de la concentration en extrait végétal.

L'extrait de prêle semble induire une mortalité sur les abeilles qui dépend autant de la dose utilisée que du temps d'observation, en particulier pour ce qui est de la toxicité orale. Ces différents résultats doivent être mis en regard des véritables concentrations de substances exposées aux abeilles en milieu naturel.

En effet, la présence dans la nourriture de concentrations de l'ordre de 10% du sirop de nourrissage suppose une forte dose d'extraits végétaux hydro-alcooliques appliquée à proximité directe de la ruche. En pratique, les extraits hydro-alcooliques montrent une toxicité relative plus grande que les extraits aqueux, il conviendra d'en tenir compte dans les futures perspectives d'homologation.

#### Les essais sur typhlodromes

Pour les plantes considérées, prêle, menthe poivrée, saule et armoise. L'effet global est NEUTRE. Ces plantes n'altèrent ni la mortalité, ni la fécondité des femelles, ni la viabilité des descendants, en comparaison avec le témoin à l'eau.

#### Les essais sur espèces aquatiques : (Tableau 2)

2a sur <i>Artemia salina</i>		2b sur <i>Daphnia pulex</i>	
Extrait	CE <sub>50</sub> (mg/mL)*	Extrait	CE <sub>50</sub> (mg/mL)*
Ecorce de saule	3,1	Ecorce de saule	215
Feuille de saule	3,7	Feuille de saule	222
Prêle	8,9	Prêle	55
Absinthe	3,5	Absinthe	172
Armoise	3,6	Armoise	69
Fongicide nitré aliphatique	> 0,05 <sup>£</sup>	Triazole benzoylurées	de 0,051 à 0,0000225

**Tableau 2** : CE<sub>50</sub> concentration efficace (immobilisation) des organismes aquatiques par les différents extraits. \* la toxicité augmente quand la concentration efficace diminue ; £ pour référence, non testé dans l'essai.

*Artemia s.* : On peut voir que pour nos extraits, d'après ces résultats, la prêle semble être l'extrait le moins toxique pour les larves de crevettes, puisque cet extrait présente la CE<sub>50</sub> la plus élevée.

*Daphnia p.* : Pour aucun des extraits n'a été constatée une variation de pH supérieure à 1,5 unité, conformément à la réglementation de l'OCDE. Les extraits d'écorce de saule et d'absinthe, qui ont la meilleure activité antibactérienne sur *Erwinia atrosepticum* sont également parmi les moins toxiques pour *Daphnia pulex*

#### 3.1.2. Les analyses des extraits.

La caractérisation des différentes classes de composés pour la composition de chaque extrait végétal, et la stabilité des extraits sont présentées dans le Tableau 3.

Extrait	Protides	Lipides + Stérols + Terpènes	Glucides + polyols	Cendres	Polyphénols	Total caractérisé après analyse
Feuille saule	2	5	18	1	19	45%
Ecorce saule	1	0	4	0,5	62	68%
Prêle	13	34	38	18	5	100%
Absinthe	6	10	21	3	6	46%
Armoise	3	24	28	3	8	66%

**Tableau 3** : Composition des extraits, % respectifs de masse sèche, des familles des composés.

#### 3.1.3. Les tests *in vitro*.

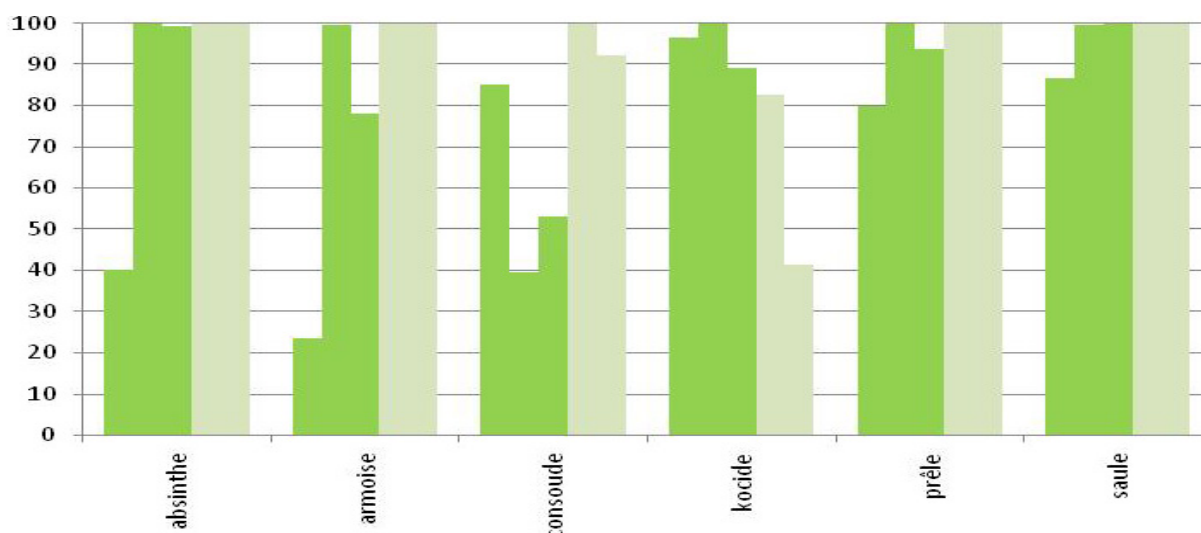
La caractérisation des effets inhibiteurs réalisée avec une seule dose [1000 ppm, soit 1g/L d'extrait sec ; qui prend en compte l'utilisation traditionnelle (100 gr de plante sèche pour 10 L)] montre que seuls les

extraits d'écorce de saule et d'absinthe présentent des activités intéressantes (Andreu V. 2013a et b) sur les souches étudiées dans ces conditions (Tableau 4).

Bio agresseur	Extrait				
	Ecorce saule	Feuille saule	Prêle	Absinthe	Armoise
<i>Botrytis allii</i> (24h)	40 ± 9%	0%	0%	30 ± 5%	0%
<i>Botrytis cinerea</i> (48h)	35 ± 9%	15%	10 ± 1%	40 ± 6%	15%
<i>Penicillium expansum</i> (48h)	30 ± 4%	10%	10%	40%	10%

**Tableau 4** : Activité inhibitrice des extraits hydro alcooliques (1g/L d'extrait sec) sur la croissance mycélienne de différences souche fongiques.

Même si, dans certains cas, le nombre de répétitions est sans doute trop faible pour conclure, les travaux menés ont permis de construire une méthodologie qui sera utile pour les prochaines années et les prochains programmes. Certains résultats sont encourageants notamment l'effet anti-germinatif sur les spores de champignons concernés, mais les tests sont à approfondir pour bien identifier les doses efficaces (courbes doses-réponses).



**Figure 3** : Représentation des efficacités relatives antigerminatives (% par rapport au témoin alcool) obtenues avec les produits sur les 5 tests anti-germinatifs (en clair les essais avec dose adaptée)

Les analyses de ces préparations ont, par contre, montré un effet antifongique avéré sur la germination des champignons pour les quatre extraits : armoise, absinthe, prêle et saule. Nos choix de plantes au départ sont donc validés. Pour le témoin alcool [avec une concentration en éthanol (95% ; 8 ml/L) ≥ éthanol des PNPP employées (éthanol (95% ; 7 ml/L max)] les résultats sont similaires au TNT (témoin non traité).

Action	Plante				
	Absinthe	Armoise	Consoude	Prêle	Saule
Antigerminatif	🔥	🔥	🔥	🔥	🔥
Curatif	X	X	X	X	X
Préventif		X	X		

**Tableau 5** : Efficacité des PNPP contre *P.viticola* ; 🔥 Efficacité avérée; 🟡 Efficacité légère ; X Sans efficacité

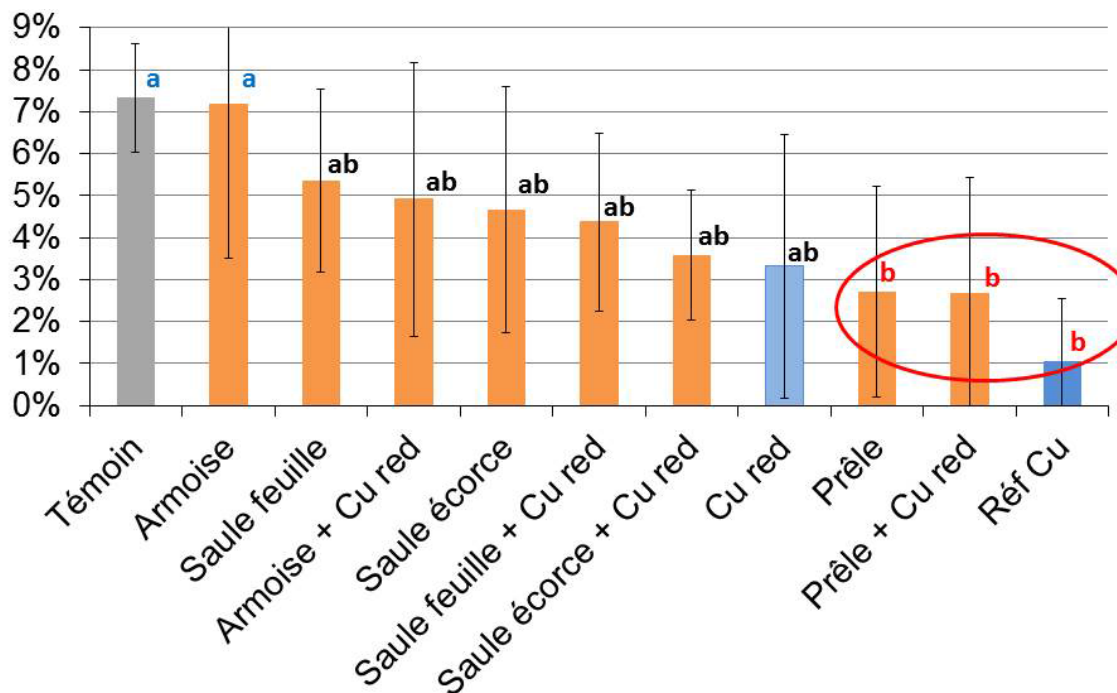
Par contre, les analyses du CESN concernant le déclenchement du métabolome concluent à une absence d'effet éliciteur de ces préparations sur les salades, pour les quatre extraits de plantes : armoise, absinthe, prêle et saule.



### 3.2 Les essais en pots

#### 3.2.1. En viticulture.

Les résultats de l'essai 2011 sur des vignes en pot au GRAB (84) montrent une bonne efficacité de la prêle, associée à une faible dose de cuivre, équivalente à celle de la référence cuivre (résultats significatifs). L'efficacité de ces mélanges est supérieure à celle du cuivre à faible dose, laissant envisager au moins une additivité, signe de compatibilité et de complémentarité.



**Figure 4** : Intensité d'attaque de mildiou sur feuille en 2011 sur vigne en pot (ANOVA  $p < 0.05$ , Test de Newman-Keuls à 5%)

### 3.3 Les essais en plein champ

#### 3.3.1. En viticulture.

Le saule associé à une faible dose de cuivre a une action intermédiaire (non significatif). Les résultats de l'essai réalisé en 2011, année à faible pression mildiou, l'absinthe associée à une dose réduite de cuivre présente 91% d'efficacité au niveau de la fréquence d'attaque sur grappes, le 04/08/11 (résultat significatif), cette bonne efficacité est comparable à celle de la référence cuivre. En 2012, année à forte pression mildiou, les modalités alternatives décrochent assez vite.

Sur grappes, seul l'extrait hydro-alcoolique de prêle a permis de réduire significativement la gravité des dégâts, fin-juin, par rapport à la dose réduite de soufre mouillable solo, gain totalement effacé à la mi-juillet. Cet extrait de prêle semblerait donc pouvoir constituer une solution alternative envisageable, mais exclusivement en situation de pression parasitaire modérée et en sachant que l'estimation de cette dernière se fait, dans le cas de l'oïdium, généralement *a posteriori*...

#### 3.3.2. En arboriculture.

L'intérêt des extraits alcooliques d'armoise, d'absinthe, de prêle et de saule blanc (feuille ou écorce) sur contaminations primaires de tavelure du pommier est validé. Il est noté des effets très intéressants des extraits alcooliques d'armoise, d'absinthe, de saule blanc feuille sur contaminations primaires sur la tavelure du poirier.

Sur la rouille du poirier, l'intérêt antifongique (observations primaires) des extraits alcooliques de l'armoise et du saule blanc feuille est validé. Sur la rouille de l'abricotier, l'intérêt des infusions d'armoise et de menthe poivrée est validé.

Nous avons par ailleurs étudié les effets potentiels sur les insectes nuisibles (observations secondaires, nous n'avons pas observé d'effet limitant sur *Monilia l.* sur abricotier, sur cloque et monilioses pêcher, ni sur puceron cendré et puceron vert du pommier (1 seule année).

Légende

<span style="background-color: #00aaff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Infusion (I)	<span style="background-color: #ffff00; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Extrait alcoolique (EA)	<span style="background-color: #90ee90; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> I et EA	<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Non testé
--	---	---	--

Intérêt

Validé <span style="color: green;">✔</span> (cible)	Non-Validé <span style="color: red;">✘</span> (cible)
---	---

Situation / pression

faible	f	Forte	F
moyenne	m	inoculations	I

Comparaison par rapport au témoin

témoin non traité	témoin cuivre	témoin alcool
TNT	TC	TA

Année	2010				2011				2012			
	Pommier		Abricotier		Pommier		Pêcher		Poirier	Pommier	Pêcher	
Bio agresseur	Tavelure		Monilioses, Rouille		Tavelure		Cloque		Tavelure, Rouille	Tavelure	Cloque, Monilioses	
Partenaire	Adabio	Fredon	CA 82	Grab	Adabio	Fredon	CA 82	Grab	Adabio	Fredon	CA 82	Grab
Avec ½Cuivre	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Armoise	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #90ee90; color: green;">✔</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	
Prêle	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #90ee90; color: green;">✔</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>
Menthe poivrée	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>				<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span>				
Saule blanc Feuilles	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T			<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span>	<span style="background-color: #ffff00; color: green;">✔</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #90ee90; color: green;">✔</span> C
Ecorce					<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T					<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>
Absinthe					<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T				<span style="background-color: #ffff00; color: green;">✔</span>	<span style="background-color: #00aaff; color: green;">✔</span> T	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>	<span style="background-color: #ff0000; color: red;">✘</span>
Comparaison	TNT	TNT	TNT	TNT	TNT	TNT	TC	TC	TC	TNT	TNT	TNT
Situation (M)	f	f	F	F	f	I	f	F	F	F	F	m
Situation (P)	F	-		-	<span style="color: red;">✘</span>	f				<span style="color: red;">✘</span>		

Tableau 6 : Efficacité des PNPP contre les champignons en arboriculture

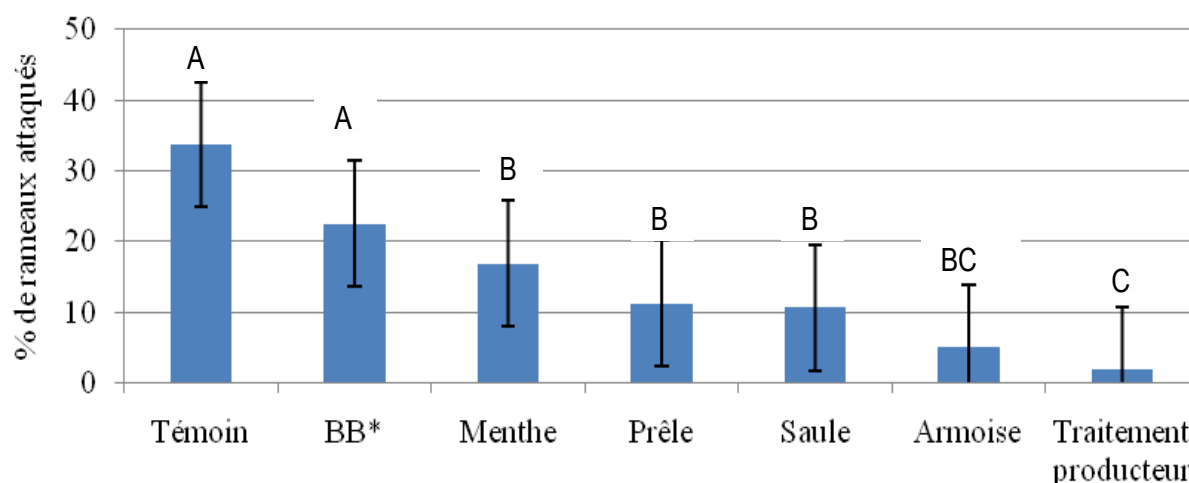


Figure 5 : Fréquence moyenne de tavelure au 2<sup>ème</sup> comptage (pic des projections primaires), essai de l'ADABIO en Savoie en 2010 : comparaison d'infusions de plantes avec ajout de demi-dose de cuivre correspondant à la modalité Bouillie Bordelaise. Les lettres A, B, BC et C correspondent aux groupes statistiquement différents d'une anova (risque 5%).

### 3.2.1. En maraîchage.

On note une efficacité relative des préparations végétales: la prêle est intéressante en protection contre le mildiou mais les résultats sont instables. Pour les activités insecticides, l'armoise vulgaire est intéressante contre le puceron de la salade et l'armoise et l'absinthe contre *M. persicae* sur salade.

Légende

Intérêt

<span style="background-color: #00aaff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Infusion (I)	<span style="background-color: #ffff00; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Extrait alcoolique (EA)	<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> Non testé			Validé <span style="color: green;">👍</span>		Non-Validé <span style="color: red;">✗</span>										
Situation pression M/P			Comparaison par rapport au témoin														
faible	f	Forte	F	témoin eau	témoin non traité	témoin cuivre	témoin alcool										
moyenne	m	inoculations	I	TE	TNT	TC	TA										
Partenaires   I : IBB P.A.I.S.   F : Fredon NPDC   S : Serail   G : GRAB   75 : CA 75   C : CIVAM Bio 66   A : ADABio																	
Année	2010			2011			2012										
Culture	Salade (Laitue)																
Bio agresseur	Mildiou ( <i>Bremia lactucae</i> ) de la salade (M), avec observation secondaire sur les pucerons (P)																
Partenaire	I	F	S	G	A	C	I	F	S	G	A	C	I	F	S	G	75
Armoise	X	XP	X <sub>P</sub>	X	X	X		👍P	👍P		👍M		X	👍P	XM		X
Prêle	X	XP	X	X	X		X		👍M	X	👍M	X		X	XM	M	X
Menthe poivrée	X	XP	X	X	X	X											
Saule blanc Feuilles	X	XP	X	X	X		X		XM		👍M	X	X	X	XM	XM	X
Saule blanc Ecorce							X		XM	X		X	X	X	XM	XM	X
Absinthe								👍P	XP		👍M		X	👍P	XM		X
Comparaison	TNT TC	TNT	TC TE	TNT TE TC	TNT	TNT TC	TNT TA TC	TNT TA TE	TNT TA TC	TNT TA TC	TNT	TNT TC TA	TNT TC	TNT TA TE	TNT TA TC	TNT TA TC	TNT
Situation (M)	f		f	F		-	f		f	m	f	F	I	F	f	F	m
Situation (P)	f		-	-		F	-	f	-	f	-	-	-			F	-

Tableau 7 : Efficacité des PNPP contre les champignons et les pucerons en maraîchage

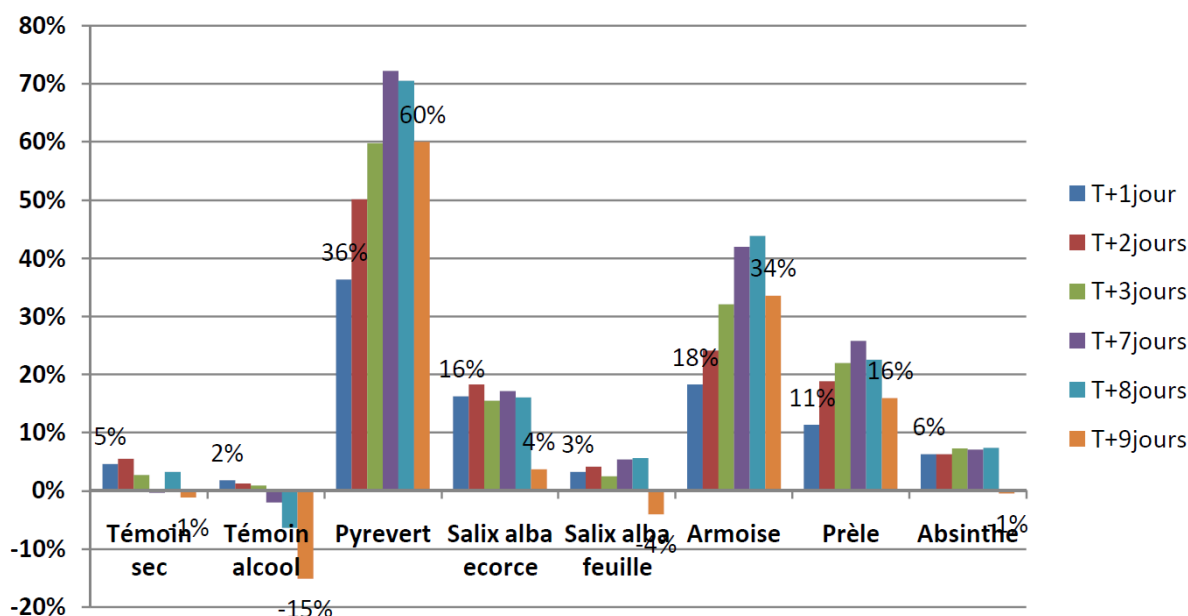


Figure 6 : Evolution de l'efficacité insectifuge sur puceron de la laitue *N. ribisnigri* par rapport au témoin eau.

On observe un intérêt insectifuge pour les extraits hydro-alcooliques d'armoise et de prêle, et d'écorce de saule dans une moindre mesure sur t. A remarquer, le témoin alcool assez négatif.

## Conclusion générale

### Analyse des résultats

Les résultats obtenus sont conformes aux attentes, avec l'efficacité réelle mais difficilement répétable et reproductible. Comme toute solution alternative, les potentiels de remplacement des pesticides synthétiques sont faibles, et les efficacités réelles en condition d'unicité de traitement (sans autre complément ex. cuivre) toutes relatives. L'efficacité des préparations à base de plantes dépend, de plus, de plusieurs facteurs : origine, âge et terroir des plantes sélectionnées, mode préparatoire (température, concentration, conservation...), conditions d'application (JT 2013, Programme 4P). Malgré tout, les produits alternatifs récents, approuvés et avec AMM, sont du même ordre d'efficacité. La littérature de départ, relativement générale, a pu être agrémentée de données précises propres à générer des homologations. Ce n'est donc pas par hasard que ces solutions ont été choisies, et les résultats *in vitro* confortent partiellement ces choix. Dans cette perspective de régularisation de l'usage des extraits, il n'a pas été recherché de substance active (s.a.) particulière, ni procédé à leur purification.

En effet, les substances communément contenues dans ces extraits sont décrites en détail dans les dossiers d'homologations correspondants (de 45 à 65 pages), qui seront rendus publics par la Commission Européenne, si approuvés communautairement. Elles ne représentent ni des substances actives caractérisées, ni, si elles sont putatives, des s.a. réelles au sens du règlement phyto.

Ceci correspond à une volonté, justifiée par :

- la difficulté de les caractériser,
- la difficulté à les isoler en l'absence de justification dans leur spécification,
- Le coût d'une telle démarche,
- L'absence même de sens pour une telle démarche, voire un antagonisme avec le postulat de départ.

En effet, on observe, pour nombre de produits phyto « biocides » présentés en substance active unique des phénomènes de résistance, ce que nous tendons à contourner. En effet ces applications peuvent (et elles l'ont démontré) être actives, utiles, voire efficaces mais sans caractéristiques biocides et tout de même « homologuées » au règlement phyto (Ex : laminarine), sans aucun souci réglementaire, surtout dans la catégorie des substances de base (article 23) que nous revendiquons pour ces PNPP.

La coordination générale a été effectuée en tenant compte de nombreuses contraintes météorologiques, humaines, conceptuelles et techniques. L'ensemble du projet a pu ainsi faire travailler, échanger et progresser ensemble les acteurs de terrain avec les acteurs de la recherche scientifique. Le chef de projet a pu alternativement diriger le projet mais aussi favoriser l'échange de l'information entre les partenaires. Les commentaires des partenaires, les retours sur expérience des expérimentateurs terrain et les conclusions du chef de projet ont été clairs sur ce point, le programme 4P a généré de nombreuses questions, plus peut-être, qu'il n'a proposé de réponse et en particulier une saine critique sur les initiaux du programme. En effet, si les conclusions des expérimentations terrain sont plutôt positives, nombre de questions *a posteriori* se sont fait jour.

Les conclusions tirées de la coordination de ce projet déboucheront sur un document guide « Conduire des essais d'expérimentation avec des extraits de plantes » prévu, à l'initiative de l'ITAB, pour 2014 qui n'était pas un livrable de départ mais qui s'avère nécessaire et utile à l'aune des écueils rencontrés.

Les difficultés pour mesurer les efficacités sont importantes, voire insurmontables dans les essais en agriculture biologique chez le producteur, car le témoin traité (référence chimique) est interdit sur ces parcelles AB. Elles ont conduit à envisager des déclinaisons estampillées Bio-contrôle dans les essais

CEB. L'évolution du projet vers les extraits hydro-alcooliques légèrement plus efficaces est à compenser avec la valeur moyenne des témoins non traités alcool (jusqu'à -25% !) et sans doute des difficultés à trouver des metteurs en marché privés potentiels pour ce type d'extraits (durée 5 ans, coût >200k€, redevance >40k€).

C'est pour cette raison que, malgré l'absence de résultats concordants, répétables et reproductibles, l'ITAB a donc proposé de procéder à la régularisation des usages des préparations aqueuses (tisanes décoctions) dans la catégorie des substances de base au règlement phytopharmaceutique CE n°, 1107/2009 (ITAB, 2013).

La prêle (*Equisetum arvense*), étudiée depuis 2007 par l'ITAB, et dont les propriétés ont été évaluées lors du programme 4P, est le premier extrait approuvé au RCE 1107 en tant que substance de base (Règlement, 2014).

### Remerciements

Le projet 4P a été financé en partie par le Casdar/DGER, et par FranceAgrimer pour certains partenaires dont le Lycée EPLEFPA des Flandres (Philippe Parent).

### Références bibliographiques

Andreu V., Bertrand C., 2013. Etude du potentiel antifongique et antibactérien d'extraits végétaux couramment utilisés en agriculture. *GFP*, Albi.

Andreu V., Amiot A., Calvayrac C., Simon-Levert A., Bertrand C., 2013. Antifungal activities of plants extracts traditionally used in organic agriculture. *Natural Products and Biocontrol*, Perpignan, France.

Bertrand B., Collaert J.P., Petiot E., 2003. Purin d'orties & Cie. Les plantes au secours des plantes, *Editions de Terran*, p.95

Bertrand C., Cochinaire A., Chanut A., Bellvert F., Popovici J., Comte G., Piola F., 2008. From allelopathy to agrochemistry: a new approach for the valorisation of invasive plants. *Planta Medica* 74, PE13

EPPO, 2000. Efficacy evaluation of plant protection products. Side effects on honey bees. Directive PP 1/170 (3).

Fiedler L., 1987. Assessment of chronic toxicity of selected insecticides to honeybees. *J. Apic. Res.* 26, 115-122.

Hsieh T.F., Huang J.H., Hsieh L.J., Hu M.F., Ko W.H., 2005. Antifungal effect of plant extracts on phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Bulletin* 14, 59-66

ITAB, 2013. Approbation communautaire : [http://www.itab.asso.fr/downloads/com-intrants/bsa-equisetum\\_dec\\_2013.pdf](http://www.itab.asso.fr/downloads/com-intrants/bsa-equisetum_dec_2013.pdf)

Journées Substances Naturelles 2013 <http://www.itab.asso.fr/publications/jt-intrants2013.php>

Kreiter S., Sentenac G., 2004 Méthode d'étude des effets non intentionnels à moyen terme sur les phytoseiidæ (typhlodromes) de la vigne des préparations phytopharmaceutiques utilisées en traitement des parties aériennes CEB 167

Lagow B., 2004. Horsetail, *Equisetum arvense*. PDR for Herbal Medicines, third edition, Montyale (NJ). ISBN 1-56363-512-7.

La Torre A., Spera G., Lolletti D., 2004. Activity of natural products against courgette powdery mildew. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 69(4), 671-678

La Torre A., Talocci S., Spera G., Valori R., 2008. Control of downy mildew on grapes in organic viticulture. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 73(2), 169-78.

Milovanovic 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 Foods Human Nutrition* 62, 113-119.

Petiot E., 2008. Les soins naturels aux arbres. *Editions de Terran*. 184 pages.

Programme 4P : <http://www.itab.asso.fr/programmes/4p.php>

RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) N° XXX/2014 DE LA COMMISSION du xx xxx 2014 portant approbation de la substance de base "Extrait d'*Equisetum arvense*", conformément au règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, et modifiant l'annexe du règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 de la Commission [COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) N° xxx/2014 concerning the approval of Extract of *Equisetum arvense* L. as basic substance under Regulation (EC) N° 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) N° 540/2011]

Villar Morales C., Ayala Orduno J.L., Rodriguez Hernandez C., Lagunes Tejeda A., 1990. Use of plant infusions and aqueous extracts for the control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*) in San Luis Potosi. *Revista Chapingo* 15(67-68), 105-107.