

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 juillet 2005 (28.07.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/068609 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 1/14,
A01N 63/04, C12P 1/02

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000008

(22) Date de dépôt international : 5 janvier 2005 (05.01.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0400076 7 janvier 2004 (07.01.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : B2B
SARL [FR/FR]; Tour de l'Horloge, 4, place Louis Armand,
F-75012 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BESNARD,
Olivier [FR/FR]; 69, avenue de Castelnau, F-34000 Mont-
pellier (FR). BES, Claude [FR/FR]; 2 Bis, rue de Verdun,
F-34000 Montpellier (FR).

(74) Mandataire : BES, Claude; Cabinet Claude Bes, 2 Bis,
rue de Verdun, F-34000 Montpellier (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de
la demande antérieure (règle 4.17.iii) pour toutes les dé-
signations

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avec revendications modifiées

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: TRICHODERMA HARZIANUM CLONES, METHOD FOR ISOLATING AND CULTURING AND FOR THE USE
THEREOF IN THE FORM OF A PHYTOSANITARY PRODUCT

(54) Titre : CLONES DE TRICHODERMA HARZIANUM, PROCEDE D'ISOLEMENT ET DE CULTURE ET APPLICATION
COMME PRODUIT PHYTOSANITAIRE

(57) Abstract: The invention relates to *Trichoderma harzianum* clones and is characterised in that said *Trichoderma harzianum*
clones are deposited in the National Collection of Microorganism Cultures (CNCM) of the Pasteur Institute under numbers I-3151
and I-1571. A method for isolating, selecting and culturing said clones and the use thereof in the form of a phytosanitary product
usable for biologically controlling fungus causing tree diseases are also disclosed.

(57) Abrégé : L'invention concerne des clones de *Trichoderma harzianum* qui se caractérisent en ce qu'il s'agit des clones de
Trichoderma harzianum déposés à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous les
numéros I-3151 et I-1571. L'invention concerne également des procédés d'isolement, de sélection et de culture de ces clones et leur
application en tant que produit phytosanitaire utilisable dans le cadre de la lutte biologique contre les champignons responsables des
maladies du bois.

WO 2005/068609 A1



CLONES DE TRICHODERMA HARZIANUM, PROCEDE D'ISOLEMENT ET DE CULTURE ET APPLICATION COMME PRODUIT PHYTOSANITAIRE

DESCRIPTION

La présente invention concerne essentiellement des clones de *Trichoderma harzianum*, un procédé d'isolement et de culture de ces clones et l'application de ceux-ci en tant que produits phytosanitaires utilisables dans le cadre de la lutte biologique contre les champignons responsables des maladies du bois de la vigne :

5 Esca (*Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus viticola* et *Eutypa lata*), Eutypiose (*Eutypa lata* et *Botryosphaeria spp*), Excoriose (*Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria spp*), dépérissement de la Syrah (*Botryosphaeria obtusa*), Black Dead Arm (*Botryosphaeria dothidea*), Symptômes de greffés-soudés (*Botryosphaeria Stevensii*).

10 Les clones de *Trichoderma harzianum* (Classification de Rifai), isolés par le déposant, ont été déposés auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur le 4 Mai 1995 sous le numéro I-1571 pour le premier et le 26 Décembre 2003 sous le numéro I-3151 pour le second.

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

Le procédé d'obtention des clones selon l'invention, prévoit :

- une phase de prélèvement dans un endroit approprié, c'est à dire connu pour renfermer des populations de champignons *Trichoderma spp* et plus spécifiquement le *Trichoderma harzianum* ;
- 25 - une phase d'isolement des champignons *Trichoderma spp* sur milieux sélectifs ;
- une phase d'isolement monoclonal (purification des isoléments) de différents clones dans le but de générer une « mycothèque », laquelle sera par la suite confrontée, pour chacun de ses membres, aux clones des différents pathovars revendiqués par la présente invention ;
- 30 - la sélection des clones les plus performants ;
- la méthode de culture et de développement de ces clones.

Par la suite, l'aspect cultural de ces clones a été identifié. Il se caractérise par une colonie d'abord blanche puis devenant verte, d'aspect irrégulier et s'organisant en

- agrégats plus ou moins condensés. Le revers est incolore, jaune ou brun. L'observation microscopique à faible grossissement révèle des arborescences terminées par des formations sphériques irrégulières (« têtes ») qui se différencient à partir d'un mycélium plus ou moins dense, étalé sur le milieu gélosé. A plus fort
- 5 grossissement, l'organisation des structures conidiogènes est telle que des ramifications se répartissent perpendiculairement et de façon opposée de part et d'autre d'un axe principal, le conidiophore. Les cellules conidiogènes (phialides) apparaissent ampulliformes. Les spores, à paroi lisse, sont de forme ovalaire et de couleur verte (environ 3 µm de diamètre).
- 10 Les caractères cultureux des clones selon l'invention ont donc permis de confirmer qu'ils appartiennent bien à l'espèce *Trichoderma harzianum* décrite selon la classification morphologique de Rifai.
- La température de croissance optimale du *Trichoderma harzianum* est de 20 à 25°C sur milieux classiques comme le malt-agar, le PDA, pulpe de betterave, flocons
- 15 d'avoine, avec un pH compris entre 4 et 7. La croissance est aérobie, la sporulation plus importante sur un milieu riche.
- Selon l'invention, le procédé d'isolement des clones et de confrontation aux pathogènes, a pour objectif d'obtenir des clones montrant :
- 20 - d'une part une croissance rapide afin qu'ils puissent être les plus efficaces vis à vis des pathogènes et présentant la plus importante production de spores par unité de milieu gélosé;
- d'autre part une production importante de composés antifongiques, production évaluée par comparaison des pouvoirs antagonistes à distance.
- Enfin, un pouvoir antagoniste puissant par contact.
- 25 Les deux derniers points seront développés dans les exemples 1 et 2.
- Le procédé d'isolement selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 30 - Prélèvement des champignons du genre *Trichoderma* dans un milieu adéquat comme un sol humide (sols maraîchers, viticole ou arboricole, matières organiques en décomposition) ou dans des bois pourris issus de ceps de vigne ou de branches d'arbres fruitiers.
- Isolement de la population de champignons *Trichoderma* prélevée, sur des milieux spécifiques choisis.

Les milieux nutritifs spécifiques sont :

- *Milieu TME de Papavizas (1982)* : un mélange de glucose (1g), gélose (20 g) et d'eau distillée (800 ml) est autoclavé. On ajoute 200 ml de V-8, le pH doit être compris entre 3,8 et 4. Au milieu encore tiède, on ajoute alors du sulfate de néomycine (100 mg), de la bacitracine (100 mg), de la pénicilline G (100 mg), du chloronèbe (100 mg), de la nystatine (20 mg), de la chlortétracycline HCl (25 mg),
5 du propionate de sodium (500 mg).

- *Milieu TSM d'Elad et al. (1981)* : Ce milieu est constitué de MgSO₄, 7 H₂O (0,2 g); K₂HPO₄ (0,9 g); KCl (150 mg); NH₄NO₃ (1 g); glucose (3 g); Chloramphénicol (250 mg); Fénaminosulf (300 mg); quintozène (200 mg); rose bengale (150 mg); gélose
10 (20 g); eau distillée (1000 ml).

- *Milieu de Davet (1979)* : Ca(NO₃)₂ (1g) ; CaCl₂, 2H₂O (1 g) ; KNO₃ (250 mg) ; MgSO₄, 7H₂O (250 mg) ; KH₂PO₄ (125 mg) ; saccharose (2 g) ; acide citrique (50 mg) ; gélose (25 g); eau distillée (1000 ml). Après autoclavage, le pH est ajusté à 4,5 avec du HCl 1N et on ajoute au milieu tiède du sulfate de streptomycine (30
15 mg), de la vinchlozoline (2,5 mg) et de l'alcool allylique (0,5 ml).

Dans le cas d'un prélèvement de sol, la technique d'isolement utilisée est celle de l'incorporation directe du sol. Le milieu sélectif d'isolement étant coulé et maintenu en surfusion en boîtes de Pétri (37 à 40°C), une faible quantité de terre est saupoudrée et immédiatement dispersée dans le milieu par agitation jusqu'à
20 solidification. Les cultures sont alors mises en incubation pendant plusieurs jours. On procède alors à l'examen, au dénombrement puis à l'isolement des colonies. Connaissant la quantité de l'échantillon de terre avant et après l'ensemencement, on peut donc connaître la masse de terre analysée et par voie de conséquence, calculer le nombre de propagules présentes par gramme de terre.

Dans le cas d'un prélèvement de matières organiques en décomposition ou de bois pourris, la technique d'isolement utilisée est celle des suspensions dilutions : Après tamisage et broyage en présence d'eau stérile, différentes dilutions successives de la suspension obtenue sont incorporées dans le milieu d'isolement. Pour ce faire, 10 ml de chacune des dilutions sont versés dans un erlenmeyer contenant 90 ml de
30 milieu sélectif d'isolement maintenu en surfusion au bain-marie (entre 37°C et 40°C). Après homogénéisation, les 100 ml sont répartis dans des boîtes de pétri placées dans les conditions optimales d'isolement des *Trichoderma*. Après un temps d'incubation de 3 à 7 jours, on repère la dilution présentant un nombre de colonies suffisant mais sans confluence. La dilution étant choisie, on peut procéder
35 à l'isolement des colonies.

Après croissance des colonies de population de *Trichoderma* en boîte de Pétri à 24°C, à la lumière pendant 3 à 7 jours, on procède à la purification des isoléments, c'est à dire à l'isolement monosporal de chacune des colonies.

5 Pour cela, pour chaque colonie, les spores de couleur verte sont prélevées, puis mises en suspension dans l'eau stérile afin de les dissocier. On réalise une culture séparée pour chaque spore dissociée sur un milieu gélosé riche tel le PDA ou flocons d'avoine en boîte de Pétri. Après 48 heures, l'ensemble des spores est remis en suspension et le titre est ajusté à 10⁶ spores/millilitre.

10 Dans le but d'obtenir les clones présentant la meilleure croissance et la meilleure production de spores, différents tests ont été mis en place pour évaluer la qualité des clones : en ce qui concerne la croissance, l'objectif est de sélectionner les clones capables de se développer le mieux sur milieu pauvre ou à des températures basses de l'ordre de 15°C.

Le procédé de sélection est caractérisé en ce qu'il comprend :

15 - pour la croissance en milieu pauvre : un prélèvement de chaque clone issu de la suspension obtenue dans le point 3 que l'on inocule dans un milieu gélosé pauvre, par exemple à l'extrait de malt (20 g/l) en boîte de Pétri et incubé à 24°C.

- pour la croissance à basse température : un prélèvement de chaque clone issu de la suspension obtenue dans le point 3 que l'on inocule dans un milieu gélosé riche, 20 par exemple au PDA (40 g/l) en boîte de Pétri et incubé à 15°C.

- pour l'évaluation de la meilleure production de spores par unité de surface de milieu gélosé : un prélèvement de chaque clone issu de la suspension obtenue dans le point 3 que l'on inocule dans un milieu gélosé riche, par exemple au PDA (40 g/l) en boîte de Pétri et incubé à 24°C.

25 Dans le but d'estimer le pouvoir antagoniste des clones vis à vis des champignons, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus viticola*, *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria sp*, on réalise un prélèvement de chaque clone issu de la suspension obtenue dans le point 3. On inocule chacun des prélèvements dans une 30 boîte de Pétri contenant du milieu nutritif malt – agar (20 g/l de gélose, 15 g/l de malt). Dans ces mêmes milieux, on place un implant prélevé dans une boîte de Pétri où l'on a réalisé préalablement la croissance du pathogène concerné. On mesure alors le pouvoir antagoniste des clones soit par contact, soit à distance par rapport à la croissance témoin de ce même pathogène. L'incubation est réalisée à 35 25°C pendant 1 à 50 jours.

Les clones qui ont démontré la plus grande performance et l'efficacité la plus importante vis à vis de l'ensemble de ces essais décrits aux points 4 et 5 sont les clones selon l'invention référencés I-3151 et I-1571.

La présente invention concerne également un procédé de culture des clones de *Trichoderma* ainsi isolés et sélectionnés et de préférence les clones de *Trichoderma harzianum* selon l'invention. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver lesdits clones et de préférence les clones de *Trichoderma harzianum* selon l'invention par une méthode de culture en surface réalisée dans un fermenteur à disques de capacité 12 litres : fermentation sur milieu gélosé PDA (dextrose [20 g/l] ; infusion de pomme de terre [200 g/l] ; Agar [15 g/l] ; eau distillée [qsp 1000 ml]).

Exemple 1 :

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 - L'inoculation du milieu de culture : le milieu est directement stérilisé dans le réacteur.
- L'inoculation se réalise au moyen de $3 \cdot 10^8$ spores/g de substrat carboné initialement présent. Une rotation des disques à faible vitesse (10trs/min) permet de retenir le milieu à la surface des disques.
- 20 - L'incubation : le fermenteur est placé dans une enceinte thermostatée à 24°C. Le temps d'incubation est de 7 jours. L'aération de la culture est réalisée par passage d'un flux d'air stérile et humidifié par barbotage dans l'eau. Le débit d'aération est de 500 ml/min.
- La récolte des spores : les spores produites à la surface des disques sont
- 25 récoltées par 5 lavages successifs, en introduisant dans le réacteur 2 litres d'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à 1% et de glycérol en maintenant une rotation rapide des disques (500 trs/min) pendant 30 minutes. Les spores mises en suspension sont ensuite dénombrées sur cellule de Malassez par comptage. Un procédé stérile de mise en ampoules scellées est alors engagé. Les ampoules sont
- 30 conservées au froid.

Les spores peuvent être aussi séchées. On procède alors à une filtration stérile du liquide contenant les spores. Le « gâteau » de filtre est alors séché puis finement broyé et tamisé. Le produit final est une poudre verte, fine présentant un diamètre inférieur à 200 µm et contenant les spores viables de *Trichoderma harzianum* ; ce

produit peut se remettre aisément en suspension dans l'eau afin d'être pulvérisé ou badigeonné.

Ces poudres de spores viables de *Trichoderma harzianum* référencés I-3151 ou I-1571 constituent le produit fondamental selon l'invention et peuvent être déclinées en différentes formulations pour application phytosanitaire. Ces poudres sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins 10^{10} spores / gramme.

En outre, les produits obtenus selon l'invention et issu des clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 se sont révélés non cellulolytiques. En effet, certains clones de *Trichoderma*, comme de nombreux micro-organismes cellulolytiques produisent de la cellulase qui dégrade la cellulose des parois végétale. Cette dégradation fait intervenir un système à composantes multiples. Trois éléments associés en un complexe enzymatique sont nécessaires pour cela : la C_1 -cellulase, la C_x -cellulase et la β -glucosidase. Or, les clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 ne présentent aucune activité C_1 -cellulase (test sur cellulose microcristalline [Avicel]).

Il n'existe donc aucune dégradation possible de la cellulose, constituant principal de la paroi des végétaux. Par conséquent, les produits selon l'invention ne pourront en aucun cas être la cause de dommages sur les végétaux lors de son application comme produit phytosanitaire.

20 **Exemple 2**

Essai de pouvoir antagoniste (contact) des *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 vis à vis de *Phaeoconiella chlamydospora*

Le champignon pathogène *Phaeoconiella chlamydospora* est isolé de plantes atteintes d'Esca . Pour la multiplication, il est repiqué à partir des tubes de conservation en boîte de Pétri contenant un milieu nutritif malt – agar (20 g/l de gélose, 15 g/l de malt, pour 1000 ml d'eau. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes).

La technique de confrontation entre les deux champignons est la suivante : Deux implants mycéliens de 6 mm de diamètre de chacun des deux champignons *Phaeoconiella chlamydospora* et *Trichoderma harzianum* sont prélevés d'une colonie à croissance active sur milieu malt et déposés dans la boîte de Pétri de façon diamétralement opposée. La distance entre les deux implants est de 45 mm. Du fait de la croissance lente de *Phaeoconiella chlamydospora*, son ensemencement est avancé de 15 jours par rapport au *Trichoderma harzianum* mis en confrontation. L'incubation est réalisée à 25°C pendant 1 à 21 jours. Trois

répétitions sont effectuées. Le témoin correspond à la croissance du champignon seul (sans la présence de *Trichoderma*).

Pendant la première semaine, les boîtes sont observées tous les jours, notées et photographiées, puis toutes les semaines. Les notations consistent à évaluer l'inhibition de la croissance de la colonie mycélienne de *Phaeoconiella chlamydospora*. Le taux d'inhibition I, exprimé en millimètres, correspond à la différence entre le rayon R1 de la colonie de la boîte témoin et le rayon R2 qui est situé sur la droite reliant le centre entre les deux protagonistes en confrontation ($I = R1 - R2$). Le taux d'inhibition est calculé au bout de 9 jours. La lecture des résultats se fait également par observation des mycéliums en confrontation : présence d'une zone d'inhibition, recouvrement d'un mycélium par un autre, compétition spatiale, zones de mélanisation, fructifications...

A la fin des confrontations, chaque implant est remis sur un milieu de culture malt – agar (20 g/l de gélose, 15 g/l de malt, pour 1000 ml d'eau. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes). La reprise ou non de la colonie est alors notée.

Deux isolats de *Phaeoconiella chlamydospora* ont été testés (Pc LR81 et PcLR47) à l'encontre de deux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571.

Les résultats sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de deux isolats de *Phaeoconiella chlamydospora* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 9 jours de confrontation)

	Pc LR81	Pc LR47
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-3151	4,2	3
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-1571	5,3	4
Rayon de la colonie témoin	16	14

L'étude du comportement des deux isolats de *Phaeoconiella chlamydospora* à l'égard des 2 clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 a permis de montrer :

Un recouvrement des deux isolats par *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571
L'existence de fructifications de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 sur les
deux isolats.

Ce test révèle donc l'importance de l'antagonisme par contact des *Trichoderma*
5 *harzianum* I-3151 et I-1571 vis à vis de *Phaeoconiella chlamydospora* : Les clones
de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 inhibent bien la croissance des deux
isolats. Elle recouvre la colonie de *Phaeoconiella chlamydospora* et produit des
fructifications à sa surface. La remise des implants de *Phaeoconiella*
chlamydospora en culture montre que les deux isolats, Pc LR81 et PcLR47, ne se
10 développent pas.

Exemple 3

Essai de pouvoir antagoniste (contact) de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571
vis à vis de *Phaeoconiella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*,
Botryosphaeria obtusa, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria stevensii*

15 Les champignons pathogènes *Phaeoconiella aleophilum*, *Fomitiporia punctata* sont
isolés de plantes atteintes d'Esca . Le champignon pathogène *Eutypa lata* est isolé
de ceps atteints d'Eutypiose. Les champignons pathogènes *Botryosphaeria obtusa*,
Botryosphaeria dothidea et *Botryosphaeria stevensii* sont isolés de ceps soit atteints
par le dépérissement de la Syrah, soit manifestant des symptômes de Black Dead
20 Arm ou encore de greffés-soudés. Pour la multiplication, ils sont repiqués à partir
des tubes de conservation boîte de Pétri contenant un milieu nutritif malt – agar (20
g/l de gélose, 15 g/l de malt, pour 1000 ml d'eau. Le milieu est stérilisé à 120°C
pendant 20 minutes).

La technique de confrontation est identique à celle utilisée dans l'exemple 2. Du fait
25 de la croissance lente de *Phaeoconiella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa*
lata, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria stevensii*
leurs ensemencements sont avancés de 8 jours par rapport aux deux *Trichoderma*
harzianum I-3151 et I-1571 mis en confrontation. L'incubation est réalisée à 25°C
pendant 1 à 50 jours. Le taux d'inhibition est calculé au bout de 4 à 12 jours selon
30 les cas.

Deux isolats de *Phaeoconiella aleophilum* ont été testés (Pa LR3 et Pa LR23).

Deux isolats de *Fomitiporia punctata* ont été testés (Fp LR30 et Fp LR14).

Deux isolats d'*Eutypa lata* ont été testés (Elcc 260 et El MT 247).

Deux isolats de *Botryosphaeria obtusa* ont été testés (Bo F 98-1 et Bo F 99-8).

35 Un isolat de *Botryosphaeria dothidea* a été testé (Bd 021).

Un isolat de *Botryosphaeria stevensii* a été testé (Bs 001).

Les résultats sont représentés dans les tableaux suivants.

5 Tableau 2 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de deux isolats de *Phaeomoniella aleophilum* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 4 ou 12 jours de confrontation)

	Pa LR3	Pa LR23
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-3151	10,7	3,5
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-1571	9,3	3,8
Rayon de la colonie témoin	17,5	15,2

10 Tableau 3 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de deux isolats de *Fomitiporia punctata* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 7 jours de confrontation)

	Fp LR30	Fp LR14
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-3151	10,7	7,7
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-1571	8,7	10,3
Rayon de la colonie témoin	26,7	22,7

15 Tableau 4 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de deux isolats d'*Eutypa lata* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 7 jours de confrontation)

	Elcc 260	EI MT 247
--	----------	-----------

Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-3151	9	12
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-1571	11,1	13,6
Rayon de la colonie témoin	36	38,7

Tableau 5 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de deux isolats de *Botryosphaeria obtusa* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 5 jours de confrontation)

5

	Bo F 98-1	Bo F 99-8
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-3151	27,3	24,6
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-1571	28,2	24,6
Rayon de la colonie témoin	48,2	43,9

Tableau 6 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de l'isolat de *Botryosphaeria dothidea* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 4 jours de confrontation)

10

	Bd 021
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-3151	21,7
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I-1571	31,7
Rayon de la colonie témoin	48,6

Tableau 7 : Taux d'inhibition (exprimé en mm) de la croissance mycélienne de l'isolat de *Botryosphaeria stevensii* face aux clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 (mesuré au bout de 5 jours de confrontation)

5

	Bs 001
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I- 3151	32,7
Taux d'inhibition par <i>Trichoderma harzianum</i> I- 1571	38.1
Rayon de la colonie témoin	54,1

L'étude du comportement des deux isolats de *Phaeomoniella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, et de l'isolat de *Botryosphaeria dothidea*, et *Botryosphaeria stevensii* à l'égard des clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 a permis de montrer :

10

La présence d'une zone d'inhibition entre chacun des deux protagonistes,

Un recouvrement des isolats de chaque espèce par *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571

L'existence de fructifications de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 sur chacun des isolats.

15

Ce test révèle donc l'importance de l'antagonisme par contact de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 vis à vis de *Phaeomoniella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria stevensii*. Les clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 inhibent bien la croissance des isolats de chaque espèce. Ils recouvrent les colonies de *Phaeomoniella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria stevensii* et produisent des fructifications à leur surface. La remise des implants de *Phaeomoniella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria stevensii* en culture montre que celles-ci ne se redéveloppent pas ou que très légèrement. Les clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571

20

25

limitent fortement le développement de la croissance mycélienne des isolats de chaque espèce.

Un test identique est réalisé pour démontrer le pouvoir antagoniste par contact vis à vis d'autres champignons pathogènes tels que *Phellinus igniarius*, *Phellinus viticola*,
5 *Phomopsis viticola*. Dans tous les cas, les tests ont montré des résultats similaires à ceux obtenus avec les tests de confrontation cités en exemples.

L'ensemble de ces tests montre bien l'intérêt des clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 pour contrôler le développement de la majorité des champignons du bois.

10 **Exemple 4**

Préparation de formulation phytosanitaire

Le produit phytosanitaire est obtenu en mettant en suspension dans l'eau le concentré stérile ou la poudre obtenue selon l'exemple 1, de façon à obtenir une concentration de 10^8 spores viables / ml de solution. Selon l'invention, le concentré
15 ou la poudre sont mis en suspension de préférence juste avant l'application par pulvérisation ou badigeonnage sur les ceps de vigne pour les protéger contre les maladies du bois citées.

Exemple 5

Adaptation des clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 pour les rendre
20 résistants à différents fongicides et bactéricides.

Afin de pouvoir intégrer l'utilisation des clones de *Trichoderma* dans un programme de traitement incluant soit des fongicides classiques soit des bactéricides, il est nécessaire de rendre ces clones résistants à divers agents chimiques, en particulier les désinfectants des bois (cuivres, molécules de synthèses, etc..)

25 On procède donc à une adaptation des clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 en les confrontant à des quantités croissantes de fongicides ou de bactéricides chimiques.

Le procédé d'adaptation est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
Evaluation des quantités minimales inhibitrices des antifongiques ou bactéricides :
30 l'appréciation de ces quantités se fait en observant, pour chaque fongicide ou pour chaque bactéricide, le développement des clones de *Trichoderma* mis en culture sur milieu gélosé à base de flocon d'avoine auquel on a ajouté des quantités croissantes du fongicide ou du bactéricide. Lorsqu'il y a arrêt de la croissance des clones de *Trichoderma harzianum*, la quantité minimale inhibitrice du fongicide ou
35 bactéricide est atteinte.

une quantité de fongicide ou bactéricide, inférieure à la quantité minimale inhibitrice est ajouté à un milieu gélosé à base de flocons d'avoine et sur lequel on étend une suspension de spores de *Trichoderma harzianum* I-3151 ou I-1571. Les boîtes sont mises à incuber pendant 5 jours, à 24°C, sous lumière.

- 5 Suite à ce temps d'incubation, on voit apparaître quelques colonies de *Trichoderma harzianum*. Ces colonies sont prélevées puis repiquées sur un milieu gélosé à base de flocons d'avoine contenant une concentration de fongicide ou de bactéricide supérieure ou égale à celle précédemment utilisée. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention de colonies résistantes aux quantités du fongicide ou du
- 10 bactéricide habituellement utilisé en viticulture.

Exemple 6

Tests d'efficacité de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 vis à vis de *Phaeomoniella aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria stevensii*

- 15 Différents types d'essais d'efficacité des clones de *Trichoderma* à l'encontre des pathogènes des bois directement dans les plants de vigne ont été testés. Les premiers concernent les capacités des *Trichoderma* à coloniser les porte-greffes, les seconds à constater les performances anti-pathogéniques.
- Sur des jeunes plants de vigne, on applique le processus suivant : traitement au
- 20 cryptonol puis greffage et chauffage optionnel, puis stratification en caisse dans une eau variant entre 28°C et 30°C pendant 3 semaines. C'est dans cette eau de trempage que sont introduits les divers micro-organismes antagonistes ou pathogènes.

a) Comportement de *Trichoderma* dans les plants après divers traitements

- 25 Les modalités testées concernent : eau courante; eau + chauffage ; eau + *Trichoderma* 10⁷spores par ml de produit ; eau + chauffage + *Trichoderma* 10⁷spores par ml de produit ; eau courante + sulfate de cuivre à 10g par 100l d'eau ; eau courante + sulfate de cuivre + *Trichoderma* 10⁷spores par ml de produit.
- On observe alors la colonisation par les *Trichoderma* après différentes périodes de
- 30 15 jours, en réalisant des coupes dans les bois, en observant au microscope et en mettant en milieu de culture ces dernières. On pratique quatre niveaux de coupes : 1 = Base; 2 = Oeil; 3 = sous la greffe; 4 = au-dessus de la greffe.
- On observe aussi les taux de reprise exprimés par la création du cal, du système racinaire et foliaire.

Matériel végétal

- ♦ Lots de 30 plants par modalité soit 180 plants par porte-greffe
- ♦ Essai sur 3 porte-greffes types Richter 10 ,504,3309
- ♦ Un seul greffon étudié.

5 Par la suite les boutures ont été plantées en terre et en pots et des observations ont été faites deux fois par an, en vue de voir les effets de l'inoculation de *Trichoderma* sur le comportement de ces plants en milieu réel. Ces observations ont consisté aux prélèvements de 20 coursons (de longueur 10 cm aux moins) pour chaque modalité. Des tests biologiques ont été effectués au laboratoire pour connaître les aptitudes de *Trichoderma* à s'installer dans les tissus et à créer une barrière protectrice dans le bois.

b) Efficacité du *Trichoderma* contre la maladie en pépinières

Le principe de cette étude consiste à inoculer des boutures, racinées ou non, avec les champignons pathogènes respectifs. Les champignons pathogènes *Phaeomoniella aleophilum*, *Fomitiporia punctata* sont isolés de plantes atteintes d'Esca. Le champignon pathogène *Eutypa lata* est isolé de ceps atteints d'Eutypiose. Les champignons pathogènes *Botryosphaeria obtusa*, *Botryosphaeria dothidea* et *Botryosphaeria stevensii* sont isolés de ceps soit atteints par le dépérissement de la Syrah, soit manifestant des symptômes de Black Dead Arm ou encore de greffés-soudés. L'efficacité potentielle du produit est jugée en fonction du comportement des plantes traitées par rapport à celui de plantes témoins (et inoculées). Le type de résultat attendu est une diminution en fréquence et/ou en intensité des symptômes foliaires.

Matériel végétal

25 Plusieurs lots de boutures sont exploités, inoculés et cultivés en serre.

Trois lots différents de boutures sont ainsi utilisés :

- boutures fructifères âgées d'un an,
- boutures non racinées « courtes », à un seul mérithalle d'une longueur de 8 à 10 cm,
- 30 - boutures foliaires à deux ou trois mérithalles, longues de 25 cm à 30cm.

Production de mycélium

Les isolats de pathogènes et de *Trichoderma* ont été cultivés en boîtes de Petri sur du milieu malt-agar (respectivement 15g/l et 20 g/l) à la température de 20 à 25°C durant 7 à 21 jours. Un volume d'eau d'environ 5mL est déposé dans chacune des boîtes. Le mycélium est séparé de la gélose en grattant la surface avec un râteau

en verre ou la lame stérile d'un scalpel. Il est ensuite récupéré avec une micro-pipette et un embout dont l'extrémité a été coupée au scalpel pour permettre l'aspiration des hyphes mycéliens. Le prélèvement de mycélium est alors placé dans un tube plastique. Le volume est ajusté si nécessaire (suspension trop dense) avec de l'eau stérile. Le tube est fortement agité manuellement afin d'homogénéiser la suspension.

Inoculation des boutures

La technique d'inoculation utilisée est celle précédemment exploitée avec succès par Laurence Chapuis (1995) pour reproduire des nécroses dans le bois. J.P. Péros a lui aussi de son côté mis au point en 1995 un autre modèle de reproduction des symptômes foliaires avec des boutures mises à raciner dans un support artificiel (pouzzolane) : ce modèle avait permis de comparer la sensibilité de différents cépages et l'agressivité de différents isolats en quelques mois seulement.

Les boutures racinées ou non racinées et cultivées en serre ont donc été inoculées de la façon suivante :

l'écorce sous l'œil est désinfectée avec un coton imbibé d'alcool, un trou de 2 mm de diamètre est percé jusqu'à la moelle, environ 2 cm en dessous de l'œil, sur l'axe orthoptique de la bouture (à la verticale de l'œil) à l'aide d'une petite perceuse munie d'une mèche stérilisée à la flamme. Le mycélium du pathogène en suspension dans l'eau (environ 20 µl) est injecté à l'aide d'une pipette dans le trou d'inoculation qui est immédiatement recouvert par de la paraffine chaude.

Les modalités de traitement sont :

- une seule dose de champignons antagonistes (*Trichoderma* à 10^7 spores par ml de produit),
- une dose d'inoculum du champignon pathogène seul,
- une dose d'inoculum du champignon pathogène suivit 24 heures après d'une dose de champignons antagonistes,
- un témoin non traité.

Analyses

On observe alors la colonisation par les micro-organismes après différentes périodes de 15 jours, en réalisant des coupes dans les bois, en observant au microscope et en mettant en milieu de culture ces dernières. On pratique quatre niveaux de coupes : 1 = Base; 2 = Oeil; 3 = sous la greffe; 4 = au-dessus de la greffe. On observe aussi les taux de reprise exprimés par la création du cal, du système racinaire et foliaire. Par la suite les boutures ont été plantées en terre et en

5 pots en vue de voir les effets de l'inoculation de *Trichoderma* sur le comportement de ces plants en milieu réel. L'efficacité est évaluée par au moins deux observations par an en fonction de l'amélioration constatée sur chacun des ceps (rémission des symptômes ou stabilisation) et par comparaison du comportement des ceps traités par rapport à celui des témoins.

c) Efficacité de *Trichoderma* contre *Phaeomoniella chlamydospora* (Esca) et *Eutypa lata* (Eutypiose et Esca)

Le principe de ces études a consisté :

- 10 - dans un premier temps, à identifier et repérer des souches malades isolées (mise en évidence de l'effet curatif) ou des souches apparemment saines (mise en évidence de l'effet préventif) dans des parcelles de vignobles atteints d'Esca,
- puis à appliquer le produit,
- pour observer ensuite pendant deux années consécutives au moins l'évolution de la symptomatologie dans les zones traitées ou non.

15 Les modalités de traitement sont :

- une seule dose de champignons antagonistes (10^7 spores par ml de produit),
- deux doses d'inoculum (1 et 1/3) du champignon pathogène ; soit pour *Eutypa lata* : 150 et 200/3 spores, et pour *Phaeomoniella chlamydospora* : 500 et 500/3 spores,
- 20 - une seule date d'inoculation : 24 heures après l'application des produits.

Méthode d'évaluation de l'efficacité

Chaque cep a fait l'objet au moins d'une observation par saison. L'efficacité a été évaluée en fonction de l'amélioration constatée sur chacun des ceps (rémission des symptômes ou stabilisation) et par comparaison du comportement des ceps traités par rapport à celui des témoins. Cette méthode a conduit, pour les besoins de l'analyse statistique, à répartir les ceps en trois classes :

- cep montrant un symptôme plus grave que lors de la première notation,
 - cep montrant un symptôme équivalent (stabilisation),
 - cep montrant un symptôme moins grave.
- 30 Les résultats sont analysés par un simple test de X^2 adapté à la comparaison de deux distributions observées. Le résultat est une différence significative entre les deux distributions autorisant ensuite l'interprétation des effectifs dans les différentes classes. Le résultat agronomique est une régression des dégâts dus à ces dépérissements se traduisant par un nombre de « ceps montrant un symptôme

moins grave » plus grand chez les ceps traités et inversement un nombre plus petit de « ceps montrant un symptôme équivalent ou moins grave ».

Selon l'invention, les clones de *Trichoderma harzianum* I-3151 et I-1571 utilisés dans le traitement des maladies du bois en viticulture sont de préférence les
5 clones rendus résistants aux fongicides et bactéricides suivant le procédé cité ci-dessus.

REVENDEICATIONS

1- Clones de *Trichoderma harzianum* caractérisés en ce qu'il s'agit des clones de *Trichoderma harzianum* déposés à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous les numéros I-3151 et I-1571.

2- Clones de *Trichoderma harzianum*, selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils possèdent les aspects cultureux suivants :

- des colonies d'abord blanches puis devenant vertes, d'aspect irrégulier et s'organisant en agrégats plus ou moins condensés ;
- des arborescences terminées par des formations sphériques irrégulières qui se différencient à partir d'un mycélium plus ou moins dense, étalé sur le milieu gélosé,
- 10 - l'organisation des structures conidiogènes est telle que des ramifications se répartissent perpendiculairement et de façon opposée de part et d'autre d'un axe principal, le conidiophore ;
- des cellules conidiogènes (phialides) apparaissent ampulliformes ;
- des spores, à paroi lisse, sont de forme ovalaire et de couleur verte (environ 3 µm
- 15 de diamètre) ;
- une température de croissance optimale de 20 à 25°C sur milieux classiques comme le malt-agar, le PDA, pulpe de betterave, flocons d'avoine, avec un pH compris entre 4 et 7 ;
- une croissance aérobie, la sporulation plus importante sur un milieu riche.

20 3- Procédé d'isolement des clones de *Trichoderma harzianum*, selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) prélèvement de champignons *Trichoderma harzianum* dans un milieu adéquat comme un sol humide (sols maraîchers, viticole ou arboricole, matières organiques en décomposition) ou dans des bois pourris issus de ceps de vigne ou de branches

25 d'arbres fruitiers ;

b) isolement des populations de champignons *Trichoderma harzianum* prélevées, sur des milieux spécifiques choisis, de préférence le Milieu TME de Papavizas (1982), le Milieu TSM d'Elad et al. (1981) ou encore le Milieu de Davet (1979) ;

c) croissance des colonies de populations de *Trichoderma* en boîte de Pétri à 24°C,

30 à la lumière pendant 3 à 7 jours ;

d) isolements monosporaux de chacune des colonies : les spores de couleur verte sont prélevées, puis mises en suspension dans l'eau stérile afin de les dissocier ;

e) réalisation d'une culture séparée pour chaque spore dissociée sur un milieu gélosé riche tel le PDA ou flocons d'avoine en boîte de Pétri ;

f) après 48 heures, l'ensemble des spores est remis en suspension et le titre est ajusté à 10^6 spores/millilitre.

4- Procédé de sélection des clones de *Trichoderma harzianum* obtenus selon le procédé de la revendication 3, présentant la meilleure croissance, la
5 meilleure production de spores et le pouvoir antagonisme le plus important vis à vis des champignons responsables des maladies du bois de la vigne, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) une croissance des clones de *Trichoderma harzianum* en milieu pauvre par un
prélèvement de chaque clone issu de la suspension obtenue dans la revendication
10 3, que l'on inocule dans un milieu gélosé pauvre, notamment à l'extrait de malt (20 g/l) en boîte de Pétri et incubé à 24°C avec observation de la croissance des clones toutes les 24 heures et évaluation de la qualité de cette croissance pour les différents clones ;

b) une croissance des clones de *Trichoderma harzianum* à basse température par
15 un prélèvement de chaque clone issu de la suspension obtenue dans la revendication 3, que l'on inocule dans un milieu gélosé riche, par exemple au PDA (40 g/l) en boîte de Pétri et incubé à 15°C avec observation de la croissance des clones toutes les 24 heures et évaluation de la qualité de cette croissance pour les différents clones. ;

20 c) une évaluation de la meilleure production de spores par unité de surface de milieu gélosé par un prélèvement de chaque clone issu de la suspension selon la revendication 3, que l'on inocule dans un milieu gélosé riche, par exemple au PDA (40 g/l) en boîte de Pétri et incubé à 24°C ;

d) une estimation du pouvoir antagoniste des clones vis à vis des champignons
25 *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus viticola*, *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria sp*, par un prélèvement de chaque clone issu de la suspension de spores, que l'on inocule dans une boîte de Pétri contenant du milieu nutritif malt – agar préalablement ensemencé par le pathogène concerné avec incubation réalisée
30 à 24°C pendant 5 jours et mesure du pouvoir antagoniste des clones soit par contact, soit à distance vis à vis du pathogène.

5- Procédé de culture des clones de *Trichoderma harzianum* obtenus selon le procédé de la revendication 4, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver lesdits clones par une méthode de culture en surface réalisée dans un fermenteur à
35 disques (fermentation sur milieu gélosé PDA) comprenant les étapes suivantes :

- a) inoculation du milieu de culture effectuée dans le réacteur au moyen de $3 \cdot 10^8$ spores/g de substrat carboné initialement présent ;
- b) incubation réalisée en plaçant le fermenteur dans une enceinte thermostatée à 24°C pendant 7 jours ;
- 5 c) récolte des spores produites à la surface des disques par lavages successifs à l'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à 1% et de glycérol ;
- d) comptage des spores en suspension sur cellule de Malassez ;
- e) stérilisation de leur mise en ampoules scellées, puis conservation à températures négatives.
- 10 6- Procédé d'obtention d'un produit à base de clones de *Trichoderma harzianum* obtenus selon le procédé de la revendication 5, caractérisé en ce qu'il consiste :
- a) à filtrer stérilement le liquide contenant les spores ;
- b) à broyer et tamiser finement le filtrat préalablement séché.
- 15 7- Utilisation de clones de *Trichoderma harzianum* selon la revendication 1 ou 2, ou obtenus selon le procédé de la revendication 3, 4 ou 5 ou d'un produit obtenu selon le procédé de la revendication 6, comme produits phytosanitaires en tant que moyen de lutte biologique.
- 20 8- Utilisation de produits obtenus à partir de clones selon la revendication 1 ou 2, ou obtenus selon le procédé de la revendication 3, 4, 5 ou d'un produit obtenu selon le procédé de la revendication 6, comme moyen de lutte biologique et comme produit phytosanitaire, par pulvérisation ou badigeonnage des ceps de vignes, ou autres plantes pérennes.
- 25 9- Application de clones de *Trichoderma harzianum* selon la revendication 1 ou 2, ou obtenus selon le procédé de la revendication 3, 4, 5 ou d'un produit obtenu selon le procédé de la revendication 6, en tant que produit phytosanitaire pour lutter contre les champignons responsables des maladies du bois de la vigne et en particulier : *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus viticola*, *Eutypa lata*,
- 30 *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria sp* , mais aussi contre les maladies des bois des arbres fruitiers, d'ornement.

REVENDICATIONS MODIFIEES
[reçues par le Bureau international le 23 juin 2005 (23.06.2005);
revendications originales 1-9 remplacées par les revendications modifiées 1-5
(2 pages)]

1- Clones de *Trichoderma harzianum* caractérisés en ce qu'il s'agit des clones de *Trichoderma harzianum* déposés à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous les numéros I-3151 et I-1571.

- 2- Clones de *Trichoderma harzianum*, selon la revendication 1, caractérisés
- 5 en ce qu'ils présentent les aspects culturels suivants :
- des colonies d'abord blanches puis devenant vertes, d'aspect irrégulier et s'organisant en agrégats plus ou moins condensés ;
 - des arborescences terminées par des formations sphériques irrégulières qui se différencient à partir d'un mycélium plus ou moins dense, étalé sur le milieu gélosé,
 - 10 - l'organisation des structures conidiogènes est telle que des ramifications se répartissent perpendiculairement et de façon opposée de part et d'autre d'un axe principal, le conidiophore ;
 - des cellules conidiogènes (phialides) apparaissent ampulliformes ;
 - des spores, à paroi lisse, sont de forme ovalaire et de couleur verte (environ 3 µm
 - 15 de diamètre) ;
 - une température de croissance optimale de 20 à 25°C sur milieux classiques comme le malt-agar, le PDA, pulpe de betterave, flocons d'avoine, avec un pH compris entre 4 et 7 ;
 - une croissance aérobie, la sporulation plus importante sur un milieu riche.

- 20 3- Procédé de culture des clones de *Trichoderma harzianum* selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver lesdits clones par une méthode de culture en surface réalisée dans un fermenteur à disques (fermentation sur milieu gélosé PDA) comprenant les étapes suivantes :
- 25 a) inoculation du milieu de culture effectuée dans le réacteur au moyen de $3 \cdot 10^8$ spores/g de substrat carboné initialement présent ;
- b) incubation réalisée en plaçant le fermenteur dans une enceinte thermostatée à 24°C pendant 7 jours ;
- c) récolte des spores produites à la surface des disques par lavages successifs à l'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à 1% et de glycérol ;
- 30 d) comptage des spores en suspension sur cellule de Malassez ;
- e) stérilisation de leur mise en ampoules scellées, puis conservation à températures négatives.

4- Utilisation de clones de *Trichoderma harzianum* selon la revendication 1 ou 2, comme produit phytosanitaire en tant que moyen de lutte biologique.

5- Application de clones de *Trichoderma harzianum* selon la revendication 1 ou 2, comme produit phytosanitaire pour lutter contre les champignons responsables des maladies du bois de la vigne et en particulier : *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus viticola*, *Eutypa lata*, *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria sp*,
5 mais aussi contre les maladies des bois des arbres fruitiers et d'ornement.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/000008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N1/14 A01N63/04 C12P1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
 EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PUNJA Z K ET AL: "Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 400-407, XP004450452 ISSN: 0167-7799 the whole document -----	
A	LUBECK M ET AL: "DELINEATION OF TRICHODERMA HARZIANUM INTO TWO DIFFERENT GENOTYPIC GROUPS BY A HIGHLY ROBUST FINGERPRINTING METHOD, UP-PCR, AND UP-PCR PRODUCT CROSS-HYBRIDIZATION" MYCOLOGICAL RESEARCH, CAMBRIDGE, GB, vol. 103, no. 3, 1999, pages 289-298, XP000922800 the whole document ----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 20 April 2005	Date of mailing of the international search report 02/05/2005
---	---

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Loubradou, G
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000008

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRONDONA I ET AL: "Physiological and biochemical characterization of <i>Trichoderma harzianum</i> , a biocontrol agent against soilborne fungal plant pathogens" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON,DC, US, vol. 63, no. 8, August 1997 (1997-08), pages 3189-3198, XP002970668 ISSN: 0099-2240 the whole document -----	
A	US 6 475 772 B1 (DHAWAN OM PARKASH ET AL) 5 November 2002 (2002-11-05) the whole document -----	
A	WO 01/83706 A (LEE SON KUG ; KIM KI WOONG (KR); CHUNG YOUNG RYUN (KR)) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document -----	
A	EP 0 466 133 A (YISSUM RES DEV CO ; PERI DEV APPLIC 1985 LTD (IL)) 15 January 1992 (1992-01-15) the whole document -----	
A	US 4 915 944 A (CHET ILAN ET AL) 10 April 1990 (1990-04-10) the whole document -----	
A	US 4 748 021 A (CHET ILAN ET AL) 31 May 1988 (1988-05-31) the whole document -----	
A	EP 0 124 388 A (SANTERRE ORSAN) 7 November 1984 (1984-11-07) the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000008

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6475772	B1	05-11-2002	NONE
<hr/>			
WO 0183706	A	08-11-2001	AT 271602 T 15-08-2004
			AU 4890601 A 12-11-2001
			DE 60104425 D1 26-08-2004
			EP 1294850 A1 26-03-2003
			JP 2003531603 T 28-10-2003
			WO 0183706 A1 08-11-2001
			US 2004151698 A1 05-08-2004
<hr/>			
EP 0466133	A	15-01-1992	IL 95066 A 19-01-1996
			AT 152320 T 15-05-1997
			AU 649050 B2 12-05-1994
			AU 8033991 A 16-01-1992
			BG 61345 B1 30-06-1997
			BR 9103028 A 28-04-1992
			DE 69125890 D1 05-06-1997
			DE 69125890 T2 21-08-1997
			EP 0466133 A2 15-01-1992
			ES 2103758 T3 01-10-1997
			GR 3024312 T3 31-10-1997
			HR 920477 A1 31-12-1995
			HU 58477 A2 30-03-1992
			JP 3059245 B2 04-07-2000
			JP 6078753 A 22-03-1994
			KR 202733 B1 15-06-1999
			MX 9100175 A1 31-01-1994
			RO 109807 B1 30-06-1995
			US 5266316 A 30-11-1993
			US 5238690 A 24-08-1993
ZA 9105314 A 25-03-1992			
<hr/>			
US 4915944	A	10-04-1990	US 4713342 A 15-12-1987
<hr/>			
US 4748021	A	31-05-1988	IL 69368 A 19-03-1990
			AT 50902 T 15-03-1990
			DE 3481577 D1 19-04-1990
			EP 0133878 A1 13-03-1985
<hr/>			
EP 0124388	A	07-11-1984	FR 2545099 A1 02-11-1984
			DE 124388 T1 21-11-1985
			EP 0124388 A1 07-11-1984
			ES 8505716 A1 01-10-1985
			ES 8605859 A1 16-09-1986
			ES 8605860 A1 16-09-1986
			JP 59210883 A 29-11-1984
			ZA 8403015 A 28-11-1984

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2005/000008

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N1/14 A01N63/04 C12P1/02	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB	
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE	
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche	
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS	
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents
no. des revendications visées	
A	PUNJA Z K ET AL: "Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 9, septembre 2003 (2003-09), pages 400-407, XP004450452 ISSN: 0167-7799 le document en entier
A	LUBECK M ET AL: "DELINEATION OF TRICHODERMA HARZIANUM INTO TWO DIFFERENT GENOTYPIC GROUPS BY A HIGHLY ROBUST FINGERPRINTING METHOD, UP-PCR, AND UP-PCR PRODUCT CROSS-HYBRIDIZATION" MYCOLOGICAL RESEARCH, CAMBRIDGE, GB, vol. 103, no. 3, 1999, pages 289-298, XP000922800 le document en entier
	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
° Catégories spéciales de documents cités:	
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*&* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
20 avril 2005	02/05/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Loubradou, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2005/000008

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GRONDONA I ET AL: "Physiological and biochemical characterization of Trichoderma harzianum, a biocontrol agent against soilborne fungal plant pathogens" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON,DC, US, vol. 63, no. 8, août 1997 (1997-08), pages 3189-3198, XP002970668 ISSN: 0099-2240 le document en entier -----	
A	US 6 475 772 B1 (DHAWAN OM PARKASH ET AL) 5 novembre 2002 (2002-11-05) le document en entier -----	
A	WO 01/83706 A (LEE SON KUG ; KIM KI WOONG (KR); CHUNG YOUNG RYUN (KR)) 8 novembre 2001 (2001-11-08) le document en entier -----	
A	EP 0 466 133 A (YISSUM RES DEV CO ; PERI DEV APPLIC 1985 LTD (IL)) 15 janvier 1992 (1992-01-15) le document en entier -----	
A	US 4 915 944 A (CHET ILAN ET AL) 10 avril 1990 (1990-04-10) le document en entier -----	
A	US 4 748 021 A (CHET ILAN ET AL) 31 mai 1988 (1988-05-31) le document en entier -----	
A	EP 0 124 388 A (SANTERRE ORSAN) 7 novembre 1984 (1984-11-07) le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR2005/000008

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6475772	B1	05-11-2002	AUCUN	
WO 0183706	A	08-11-2001	AT 271602 T	15-08-2004
			AU 4890601 A	12-11-2001
			DE 60104425 D1	26-08-2004
			EP 1294850 A1	26-03-2003
			JP 2003531603 T	28-10-2003
			WO 0183706 A1	08-11-2001
			US 2004151698 A1	05-08-2004
EP 0466133	A	15-01-1992	IL 95066 A	19-01-1996
			AT 152320 T	15-05-1997
			AU 649050 B2	12-05-1994
			AU 8033991 A	16-01-1992
			BG 61345 B1	30-06-1997
			BR 9103028 A	28-04-1992
			DE 69125890 D1	05-06-1997
			DE 69125890 T2	21-08-1997
			EP 0466133 A2	15-01-1992
			ES 2103758 T3	01-10-1997
			GR 3024312 T3	31-10-1997
			HR 920477 A1	31-12-1995
			HU 58477 A2	30-03-1992
			JP 3059245 B2	04-07-2000
			JP 6078753 A	22-03-1994
			KR 202733 B1	15-06-1999
			MX 9100175 A1	31-01-1994
			RO 109807 B1	30-06-1995
			US 5266316 A	30-11-1993
			US 5238690 A	24-08-1993
			ZA 9105314 A	25-03-1992
US 4915944	A	10-04-1990	US 4713342 A	15-12-1987
US 4748021	A	31-05-1988	IL 69368 A	19-03-1990
			AT 50902 T	15-03-1990
			DE 3481577 D1	19-04-1990
			EP 0133878 A1	13-03-1985
EP 0124388	A	07-11-1984	FR 2545099 A1	02-11-1984
			DE 124388 T1	21-11-1985
			EP 0124388 A1	07-11-1984
			ES 8505716 A1	01-10-1985
			ES 8605859 A1	16-09-1986
			ES 8605860 A1	16-09-1986
			JP 59210883 A	29-11-1984
			ZA 8403015 A	28-11-1984