

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITE DE LIEGE
GEMBLOUX AGRO-BIOTECH

ETUDE DES MECANISMES D'ACTION IMPLIQUES DANS LE BIOCONTROLE
D'UNE SOUCHE D'AUREOBASIDIUM PULLULANS (DE BARY) ARNAUD VIS-
A-VIS DE PENICILLIUM EXPANSUM LINK SUR POMMES EN POST-RECOLTE

Mme. Sanae KRIMI BENCHEQROUN

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du
Grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : Pr. M. Haïssam Jijakli

Rapporteurs : Pr. Hugo MAGEIN

Pr. Samir EL JAAFARI

KRIMI BENCHEQROUN Sanae (2009). Etude des mécanismes d'action impliqués dans le biocontrôle d'une souche d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud vis-à-vis de *Penicillium expansum* Link sur pommes en post-récolte, 104p.

RESUME : L'agent de lutte biologique *Aureobasidium pullulans* souche Ach1-1 a présenté une grande potentialité dans le contrôle de *Penicillium expansum*, l'agent causal de la pourriture bleue des pommes en conservation. Les mécanismes d'action qui sont les plus impliqués dans son activité antagoniste ont été analysés, au cours de ce travail. D'après des essais de protection réalisés sur pommes blessées, il apparaît que l'efficacité de cette souche n'est pas liée essentiellement à la sécrétion des métabolites toxiques dans le milieu ou à l'induction de la résistance de fruit. Par contre, le mécanisme de la compétition pour la nutrition semble jouer un rôle important. Dans les essais *in vitro*, la souche antagoniste Ach1-1 a eu un important effet inhibiteur de la germination des conidies de *P. expansum* dans des milieux de jus de pomme à des faibles concentrations. Mais cet effet était réversible et les conidies inhibées étaient capables de germer une fois remises dans des conditions favorables en éléments nutritifs. Sur pommes blessées, l'effet protecteur de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* a été significativement affaibli par l'ajout dans les blessures de concentrations élevées des principaux composants des pommes en sucres, en vitamines et particulièrement en acides aminés. Il apparaît que l'antagoniste exerce une activité fongistatique plus que fongicide vis-à-vis de *P. expansum* et agit par une compétition efficace pour les éléments nutritifs des blessures des pommes sans affecter la viabilité des conidies du pathogène. Une application exogène des acides aminés des pommes avec des concentrations croissantes dans les blessures a progressivement réduit l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 sans altérer son développement dans les blessures, montrant que la compétition pour les acides aminés joue un rôle important dans la suppression de *P. expansum*. Ce résultat a été appuyé par l'analyse biochimique de la cinétique de l'épuisement des acides aminés dans les blessures des pommes qui a montré que ces composés et particulièrement la sérine, la glycine et l'acide glutamique sont mieux métabolisés par la souche antagoniste que par le pathogène. L'ajout en excès de ces trois acides aminés en groupe ou individuellement dans les blessures des pommes a fortement réduit l'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum*. De plus, la présence de la sérine et la glycine avec des concentrations élevées dans des milieux synthétiques ne présentant aucune source azotée, a réduit l'effet inhibiteur de la germination des conidies de *P. expansum* par la souche Ach1-1. Ainsi, ces acides aminés semblent être parmi les éléments les plus limitants dans le mécanisme de la compétition.

KRIMI BENCHEQROUN Sanae (2009). Study of mechanisms of action involved in the Biocontrol of a strain of *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud against *Penicillium expansum* Link on postharvest apples, 104p.

SUMMARY- The biocontrol agent *Aureobasidium pullulans* strain Ach1-1 was very effective against *Penicillium expansum*, the causal agent of blue mold on stored apple. Modes of action that could be involved in its biocontrol activity were analysed in this work. According to some biocontrol trials on wounded apples, it appears that neither the production of metabolites nor the induction of fruit resistance were the principal modes of action of this strain. However the mechanism of nutrient competition appears to play an important role. In *in vitro* assays, the strain Ach1-1 had an important inhibitory effect of conidial germination of *P. expansum* in apple juice at low concentrations. However this inhibitory effect was suppressed when inhibited conidia were placed in favourable nutrients conditions. On wounded apples the protective activity of strain Ach1-1 against *P. expansum* was significantly reduced by adding, in the wounds, high concentrations of major apple compounds of sugar, vitamins and most particularly amino acids. It appears that the antagonist exerts a fungistatic rather than fungicidal activity on *P. expansum* as it can deplete limiting nutrient available at the infection site and inhibit conidia germination without affecting their viability. Moreover, an exogenous application of increasing apple amino acids concentrations in wounds had progressively reduced the antagonist activity of strain Ach1-1 without altering its development in wounds, suggesting that competition for apple amino acids by strain Ach1-1 plays an important role in suppressing *P. expansum*. This finding was strengthened by a time-course analysis of wounds amino acids during apple incubation in which the strain Ach1-1 was able to assimilate apple amino acids better than *P. expansum*, most particularly Serine, Glycin and Glutamic acid. Exogenous additions of these three amino acids at high concentrations on apple wounds as a mixture or individually, strongly lowered the Biocontrol activity of strain Ach1-1. Moreover, the existence of amino acids serine and glycin at high concentration in synthetic media, without any nitrogen source, was able to reduce the inhibitory effect of conidial germination of *P. expansum* by the strain Ach1-1. Therefore these amino acids could be among the most limited nutrients in the mechanism of competition.

Copright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de des modifications ultérieures.

Remerciements

Dans un premier lieu, j'exprime ma profonde gratitude à **DIEU** pour m'avoir permis de réaliser ce travail et pour m'avoir guidée tout au long de mon trajet.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon Professeur **Haïssam JIJAKLI** pour m'avoir accueillie dans l'unité de Phytopathologie et pour m'avoir aidée à réaliser ce travail avec rigueur et patience. Ses qualités scientifiques et humaines, et ses conseils judicieux m'ont été profitables au plus haut point.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma considération à **Mr. Samir El JAAFARI** de m'avoir intégrée dans le projet PIC et d'avoir toujours su faire preuve d'une grande disponibilité et d'une extrême gentillesse. Ses qualités scientifiques et humaines indéniables m'ont été d'un grand apport.

Je suis particulièrement reconnaissante à **Mrs. Sébastien MASSART et Mohamed BAJJI** pour m'avoir encadrée et pour l'apport scientifique qu'ils m'ont prodigué au cours de la réalisation de ce travail.

Je tiens vivement à remercier **Mr. Hugo MAGEIN** pour avoir bien accepté de rapporter ce travail et pour les corrections minutieuses qu'il a apportées.

Je remercie également **Mr. Jean-Pierre Baudoin** de me faire l'honneur de présider ce travail ainsi que **Mme. Monique BODSON et Mr. Guy MERGEAI** pour bien vouloir être parmi les membres de jury.

Une grande part de ma reconnaissance s'adresse à **Mr. Mustapha LABHILILI, Mme. Fatiha BENTATA et Mr Alain DURIEUX** pour m'avoir accueillie chaleureusement dans leurs laboratoires à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) à Rabat et à l'Unité de Biotechnologie à l'Université Libre de Bruxelles ainsi que pour leur aide matérielle et scientifique qui m'a permis de mener à bien certaines parties de ce travail.

Je tiens également à remercier **Mr. Hassan ACHBANI, Mr. Mohamed GUILLY et toute l'équipe du projet PIC** pour le soutien et la disponibilité dont ils ont fait preuve.

Je n'oublierai pas de remercier profondément **Mr. Busogoro, Imène, Nadia, Sophie, Damien, Ludivine, Héliane, Gladys, Paulette et toute l'équipe de l'Unité de phytopathologie** pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité qui ont été d'un grand soutien pendant mes séjours en Belgique.

Ma plus profonde reconnaissance s'adresse aux personnes qui me sont les plus chères: **mes parents, mon mari, mes frères et toute la famille** pour leur encouragement et leur soutien constant. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus sincères d'affection et d'amour.

Ce travail de thèse a été subsidié par la **DGCD-CUD** (Direction Générale de la Coopération au Développement-Commission Universitaire pour le développement) que je souhaite remercier pour m'avoir soutenu financièrement durant mes séjours en Belgique.

Enfin, que toutes les personnes qui y ont contribuées de près ou de loin trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents et à la mémoire de mon très cher mari qui a fait preuve de beaucoup de patience et de soutien au long de ce trajet et qui a tellement souhaité voir le fruit de nos efforts...

Puisse Allah le rend fier de moi et nous rassembler au paradis...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I- Importance économique de la culture des pommes au Maroc	3
II- Principales maladies de post-récolte des pommes au Maroc	4
II.1- La pourriture bleue.....	4
II.2- La pourriture grise	5
III- Méthodes actuelles de lutte contre les maladies de post-récolte des pommes.....	7
III.1- Méthodes prophylactiques.....	8
III.2- Traitements chimiques	9
III.3- Thérapie	10
III.4- Nouvelles technologies pour le contrôle des maladies en conservation	11
III.4.1- Induction de la résistance des fruits	11
III.4.2- Transformation génétique de la plante hôte	12
III.4.3- Biocides naturels	12
III.4.4- Utilisation des agents de contrôle biologique	13
IV- Potentiels de lutte biologique sur fruits en conservation	13
V- Les modes d'action des agents antagonistes	16
V.1-Importance et difficultés	16
V.2- Les principaux modes d'action	17
V.2.1- Antibiose	17
V.2.2-Mycoparasitisme	20
V.2.3-Induction de résistance chez l'hôte	21
V.2.4- Compétition pour la nutrition et pour l'espace	22
V.3- Utilisation de la biologie moléculaire pour la compréhension des mécanismes d'action	24
VI- Les approches méthodologiques utilisées pour l'étude du mécanisme de la compétition	25
VI.1- Etude de l'effet de colonisation de l'antagoniste sur le biocontrôle	26
VI.2- Etude de l'effet de la consommation des éléments nutritifs par l'antagoniste	27
VI.3- Effet de la concentration des éléments nutritifs du milieu sur l'interaction de l'antagoniste et du pathogène.....	29
VII- Amélioration de l'efficacité de la lutte biologique contre les maladies de post-récolte.....	31
VII.1- Amélioration de la formulation	31
VII.2- Manipulations physiologiques et génétiques.....	33
VII.3- Combinaison de plusieurs antagonistes	34
VII.4- Intégration de la lutte biologique à d'autres méthodes de lutte	35
VIII. La lutte biologique avec <i>Aureobasidium pullulans</i>	36
VIII.1- Présentation de l'espèce	36
VIII.2- <i>Aureobasidium pullulans</i> en tant qu'agent de biocontrôle.....	37
VIII.3- Mécanismes d'action de certaines souches potentielles d' <i>A. pullulans</i>	38
CHAPITRE II : OBJECTIFS	40

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES 42

I- Matériel biologique et milieux de cultures.....	42
I.1- La souche pathogène	42
I.2- La souche antagoniste	42
I.3- Autres souches microbiennes	43
I.4- Le matériel végétal	43
I.5- Milieux de cultures utilisés	43
II- Niveau d'efficacité d'<i>A. pullulans</i> vis-à-vis de <i>P. expansum</i> sur pomme	44
III- Evaluation de l'implication des métabolites toxiques et de l'induction de résistance chez les pommes dans l'activité antagoniste des souches d'<i>A. pullulans</i> <i>in situ</i>	44
III.1- Production des composés antifongiques.....	44
III.2- Induction de la résistance des fruits traités par les souches antagonistes	45
IV- Etude <i>in vitro</i> de l'implication de la compétition pour la nutrition de souches d'<i>A. pullulans</i> dans l'inhibition de la germination des conidies de <i>P. expansum</i>	46
IV.1- Cinétique de croissance des souches d' <i>A. pullulans</i> dans des milieux restreints en éléments nutritifs ..	46
IV.2- Etude de la compétition pour la nutrition <i>in vitro</i>	47
IV.3- Evaluation de la présence des métabolites toxiques	49
V- Evaluation <i>in situ</i> de l'implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'<i>A. pullulans</i>.....	49
V.1- Compétition pour les éléments nutritifs des pommes.....	49
V.2- Importance de la compétition pour les acides aminés des pommes	51
VI- Analyse de l'assimilation des acides aminés des pommes par l'antagoniste et/ou le pathogène par chromatographie en phase liquide.....	51
VII- Compétition pour des acides aminés spécifiques	52
VII.1- Compétition <i>in vivo</i> pour des groupes d'acides aminés	52
VII.2- Compétition <i>in vivo</i> pour des acides aminés individuels	52
VII.3- Effet <i>in vitro</i> des acides aminés sur la germination des conidies du pathogène	53
VIII- Analyse statistique	53

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION 55

I- Niveau d'efficacité d'<i>A. pullulans</i> vis-à-vis de <i>P. expansum</i> sur pomme	55
II- Evaluation de l'implication des métabolites toxiques et de l'induction de résistance chez les pommes dans l'activité antagoniste des souches d'<i>A. pullulans</i> <i>in situ</i>	56
II.1- Production des composés antifongiques	56
II.2- Induction de la résistance des fruits traités par les souches antagonistes	58
III- Etude <i>in vitro</i> de l'implication de la compétition pour la nutrition de souches d'<i>A. pullulans</i> dans l'inhibition de la germination des conidies de <i>P. expansum</i>	60
III.1- Cinétique de croissance des souches d' <i>A. pullulans</i> dans des milieux restreints en éléments nutritifs ..	60
III.2- Etude de la compétition pour la nutrition <i>in vitro</i>	62
III.3- Evaluation de la présence des métabolites toxiques <i>in vitro</i>	64
III.4- Discussion	65
IV- Evaluation <i>in situ</i> de l'implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'<i>A. pullulans</i>.....	67
IV.1- Compétition pour les éléments nutritifs des pommes	67
IV.2- Compétition pour les acides aminés des pommes.....	68
IV.3- Discussion	70

V- Analyse de l'assimilation des acides aminés des pommes par l'antagoniste et/ou le pathogène par chromatographie en phase liquide.....	71
VI- Compétition pour des acides aminés spécifiques	73
VI.1- Compétition <i>in vivo</i> pour des groupes d'acides aminés	73
VI.2- Compétition <i>in vivo</i> pour des acides aminés individuels.....	74
VI.3- Effet <i>in vitro</i> des acides aminés spécifiques sur la germination des conidies du pathogène	75
VI.4- Discussion	76
CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS.....	79
CHAPITRE VI : PERSPECTIVES	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85
ANNEXES	101

INTRODUCTION GENERALE

La filière des pommes occupe une grande importance dans l'économie marocaine en couvrant une superficie de 26.700 ha. Le Maroc est le second producteur de pommes en Afrique après l'Afrique du Sud. Il contribue pour 30% de la production de ce continent (MADRPM, 2006). Cependant, la part de la production des pommes entreposées dans les frigos subit des pertes importantes, essentiellement dues aux problèmes phytosanitaires. Les principaux agents responsables de ces maladies au Maroc sont les champignons de blessures *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*.

Actuellement la lutte chimique reste la principale mesure de contrôle existante pour combattre les maladies des pommes en conservation. Néanmoins, plusieurs facteurs ont conduit à rechercher d'autres méthodes de lutte. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer entre autre l'apparition de phénomène de résistance chez les pathogènes, la détection de résidus sur les denrées alimentaires, les exigences du consommateur et le retrait de l'agrégation de certains fongicides efficaces destinés à cet usage comme le Benomyl et le Carbendazime (Communiqués de presse, 2003 ; 2008).

Parmi les alternatives développées en vue de complémenter ou de remplacer partiellement l'usage des fongicides synthétiques, la lutte biologique s'avère une mesure très prometteuse, spécialement dans le domaine de post-récolte. Un grand nombre de levures et de bactéries ont été rapportées comme des agents biologiques efficaces contre les maladies de post-récolte (Jijakli et Lepoivre 1998 ; Punja and Utkhede, 2003; Spadaro and Gullino, 2003; Fravel, 2005; Yu et al, 2008 ; Mikani et al, 2008). Parmi ces agents biologiques, plusieurs souches de la pseudo-levure *Aureobasidium pullulans* ont montré un niveau élevé de protection vis-à-vis de plusieurs pathogènes de post-récolte (et notamment *B. cinerea* et *P. expansum*) chez plusieurs cultures importantes comme les pommes, les raisins et les fraises (Lima et al., 1999, 2003; Ippolito et al., 2000, 2005; Castoria et al., 2001; Adikaram et al., 2002). Récemment, une nouvelle souche potentielle d'*A. pullulans* (Ach1-1) a été isolée à partir de la surface des pommes et a été sélectionnée pour ses propriétés antagonistes vis-à-vis des pathogènes *B. cinerea* et *P. expansum* (Achbani et al., 2005). Cependant, les mécanismes d'action intervenant dans son activité de biocontrôle ne sont pas encore déterminés. Pourtant, l'étude des modes d'action revêt une importance cruciale dans le développement d'une

stratégie de lutte biologique efficace. Leur connaissance permet d'optimiser les méthodes de sélection des agents de contrôle biologique efficaces, le développement d'une formulation appropriée renforçant ces mécanismes, le développement d'une procédure de contrôle de la qualité après la production et l'homologation du produit commercial. Ainsi, le présent travail contribue à étudier l'implication des principaux modes d'action dans l'activité antagoniste de cette souche vis-à-vis de *P. expansum* et plus particulièrement de la compétition pour les éléments nutritifs.

La compétition pour la nutrition constitue l'un des mécanismes d'action les plus importants, essentiellement vis-à-vis des pathogènes de blessure qui sont typiquement dépendants des éléments nutritifs exogènes pour leur développement. La démonstration expérimentale de ce mécanisme reste difficile à réaliser, eu égard essentiellement, au manque de méthodes appropriées pour étudier ce type d'interaction. Ainsi dans la littérature, la plupart des études réalisées à ce propos ont recours à des approches *in vitro* ou *in situ* et ne différencient pas entre la part de l'implication de la compétition pour la nutrition et de la compétition pour l'espace (Castoria et al., 1997, 2001; Lima et al., 1997; Janisiewicz et al., 2000; Guetsky et al., 2002; Vero et al., 2002).

Dans notre étude, la compétition pour la nutrition a été examinée dans les conditions *in vitro* en utilisant un système qui permet la distinction entre la compétition pour la nutrition et pour l'espace. Ensuite, l'étude a été complétée par des essais de protection *in situ* en utilisant des concentrations élevées des composants majeurs de la pomme (acides aminés, vitamines et sucres) ainsi que par des analyses chromatographiques de la dégradation des acides aminés dans les blessures des pommes.

CHAPITRE I :

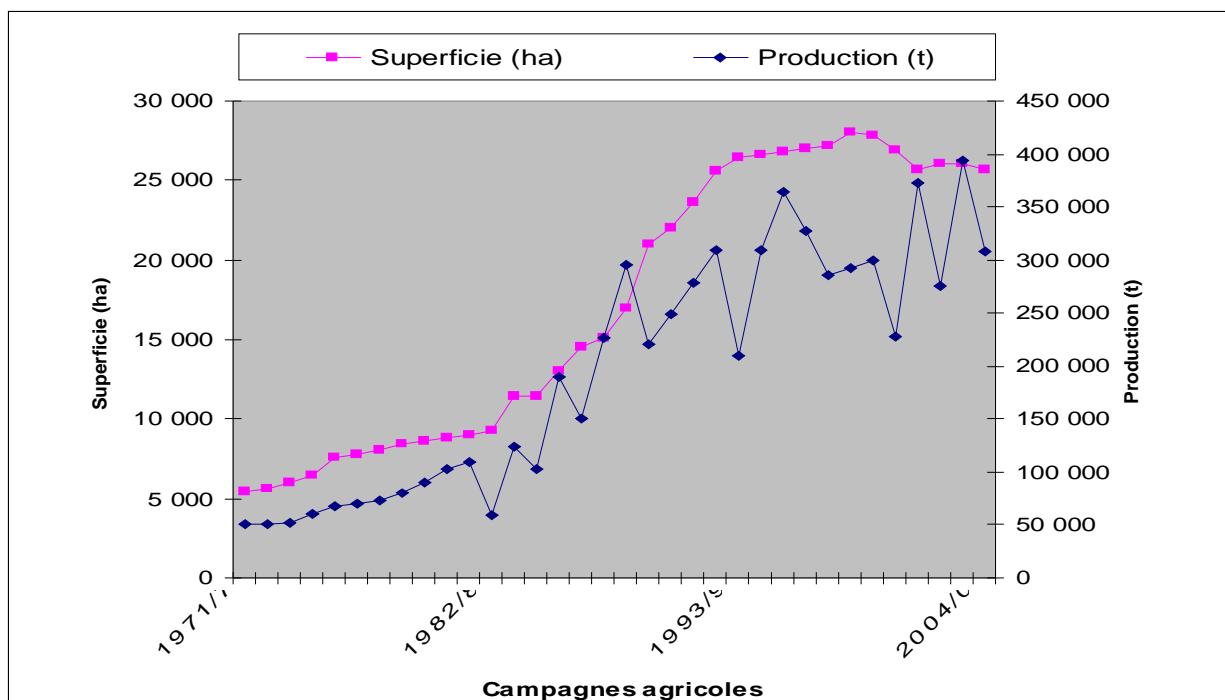
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I - Importance économique de la culture des pommes au Maroc

La culture du pommier au Maroc a connu une évolution très rapide durant ces dernières années. Depuis 1982, la superficie et la production du pommier ont presque quadruplé pour atteindre 26 700 ha et 372 500 T respectivement pendant la campagne 2004-2005, soit un rendement moyen de 14 t/ha (Graphique 1) (MADRPM, 2006). Actuellement, le pommier se place au deuxième rang après l'amandier au niveau des superficies réservées aux Rosacées. Les plus importantes zones de production sont localisées en hautes et moyennes altitudes du haut et du moyen Atlas avec certains pôles de concentration. Cette répartition donne au secteur un poids important dans l'économie du pays par la création d'emplois (2 millions de journées de travail) et en générant une valeur commerciale de l'ordre de 1,5 milliards de dirhams (Oukabli, 2004).

Graphique 1 : Evolution des superficies et des productions de la culture de pommes au Maroc (MADRPM, 2006)



II - Principales maladies de post-récolte des pommes au Maroc

Les maladies de conservation causent des pertes économiques importantes dans le monde entier et notamment au Maroc. Ces pertes peuvent varier de 5 à 20% aux Etats-Unis et peuvent dépasser 50% dans les pays en voies de développement (Janisiewicz et Korsten, 2002). Plusieurs espèces fongiques ont été isolées à partir des fruits de pommes pourries rassemblées de différentes chambres froides de la région de Kénitra (Maroc), à savoir *Rhizopus stolonifer*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Monilia fructigena*, *Cladosporium herbarum*, *Spilocaea pomi*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Trichothecium roseum* et *Penicillium expansum* (Attrassi et al., 2005). Cependant, selon une enquête réalisée dans les principales régions de production de pomme au Maroc (particulièrement dans les stations frigorifiques et les marchés locaux), les pathogènes les plus nuisibles des pommes récoltées sont les champignons des blessures *P. expansum* et *B. cinerea* (Achbani et al., 2005).

II.1- La pourriture bleue

La pourriture bleue causée par *P. expansum* est la maladie la plus répandue des pommes en post-récolte (Janisiewicz, 1999 ; Sholberg et Conway, 2004). Ce champignon ne cause pas seulement des pourritures mais peut également produire une mycotoxine « la patuline » qui est dangereuse pour la santé humaine (Immunotoxique, neurotoxique, néfaste sur l'appareil gastro-intestinal) (Roussel et al., 2007). Cette mycotoxine peut réduire considérablement la valeur des fruits attaqués et les rend inacceptables au commerce.

Les symptômes typiques de la pourriture bleue sont des lésions humides de forme généralement circulaire avec un contour net et de couleur brun clair. La surface des pourritures âgées peut être couverte par des spores blanchâtres qui deviennent vert- bleuâtres, d'où le nom de la maladie. Cette pourriture est à évolution rapide sur les fruits mûrs et elle est plus lente sur ceux qui n'ont pas encore atteint le pic climactérique. Elle est généralement distinguée par une odeur de moisir (Janisiewicz, 1999).

Les spores de *P. expansum* peuvent se conserver d'une saison à l'autre dans les caisses de stockage où le champignon peut croître et se multiplier. La contamination de celles-ci par les spores peut se faire par différentes sources à savoir le sol des vergers, les fruits infestés ou via l'air (Janisiewicz, 1999; Sanderson, 2000). Il est remarqué que la contamination des fruits destinés au stockage se produit principalement lors du traitement au drencher avec l'antioxydant diphenylamine (DPA) qui est utilisé pour la protection contre l'échaudure superficiel; aux USA par exemple. Ainsi, la concentration en spores dans la solution augmente successivement avec chaque caisse drenchée et peut atteindre des taux élevés si la solution n'est pas changée régulièrement. L'inoculation peut également se produire par les eaux utilisées pour le traitement des fruits contre les maladies de post-récolte avant leur stockage. Les spores produites sur les lésions de pourriture des fruits peuvent être dessimées dans les chambres de stockage par les ventilateurs de réfrigération et peuvent contaminer de nouveaux fruits (Sanderson, 2000).

P. expansum est nécrotrophe et présente une phase saprophytique à la surface des fruits avant de développer une structure infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface (Blakeman et Brodie, 1977). Ainsi, l'infection primaire de la maladie commence par les blessures qui constituent la porte d'entrée du pathogène. Ces blessures sont causées principalement par des accidents lors de la cueillette ou par les piqûres d'insectes ou de rameaux. Parfois, l'infection peut se produire à travers les lenticelles, particulièrement quand elles sont éclatées par un hydrocraquage pendant une période humide qui suit directement une période sèche ou quand les fruits deviennent très mûrs (Janisiewicz, 1999).

II.2- La pourriture grise

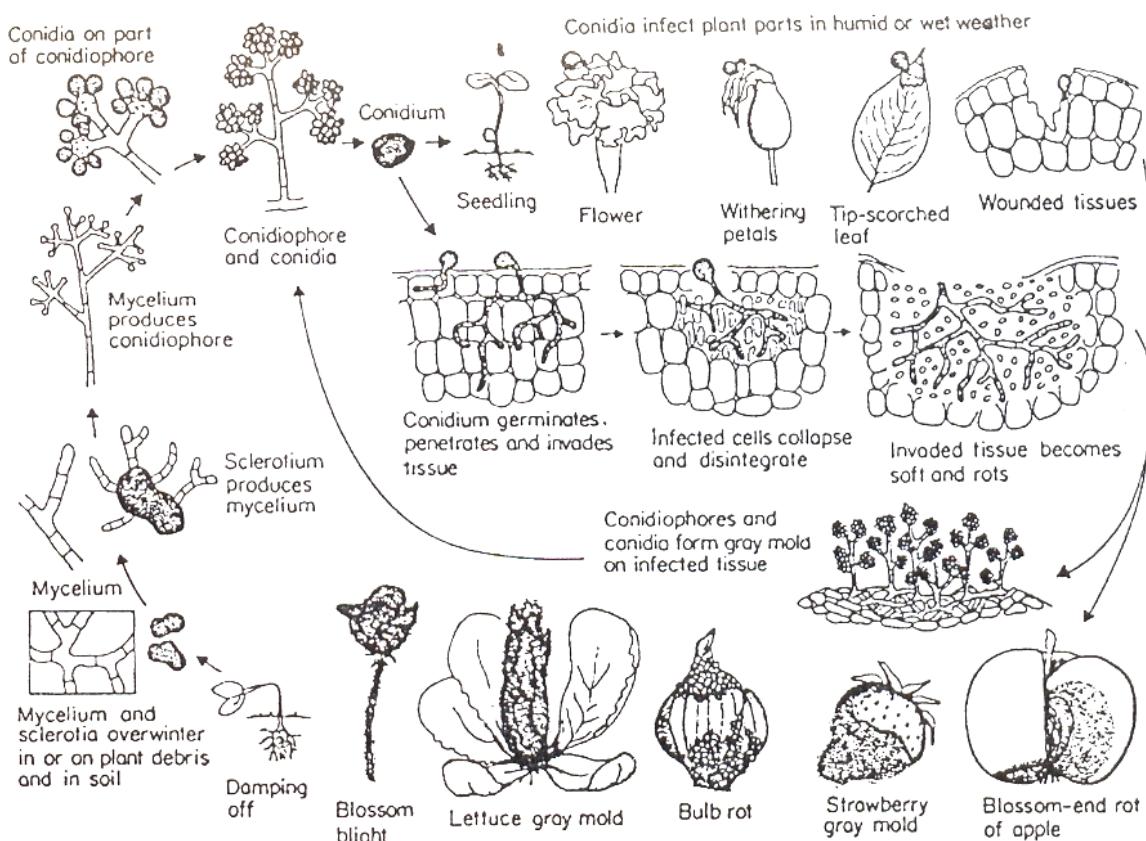
La pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* est parmi les maladies les plus largement répandues à travers le monde sur un grand nombre d'espèces (légumes, plantes ornementales, petits fruits, fruits à pépins) et peut occasionner des pertes très importantes. Aux Etats-Unis, cette maladie est la cause principale de pertes de post-récolte sur poires et la deuxième en importance, après la pourriture bleue sur pommes (Rosenberger, 1991).

Quand les fruits des pommes sont attaqués par *B. cinerea* au verger via les pétales sénescents, il y a formation d'une pourriture sèche de l'œil caractérisée par un brunissement et un dessèchement qui peuvent s'étendre à l'intérieur du tissu de la pomme. Mais il a été remarqué que cette pourriture sèche se développe rarement en pourriture grise sur les fruits conservés (Manning et Percy, 1997).

En post-récolte, *B. cinerea* infecte les fruits via les blessures et cause des pourritures humides caractérisées par une altération de la chair, avec des contours nets et irréguliers. La chair acquiert une consistance humide ou molle et prend une coloration brun clair à brun moyen en surface et brun clair en profondeur (Rosenberger, 1991). En conditions humides, un feutrage gris dense constitué par les fructifications se développe à la surface des tissus infectés exposés à la lumière. Par contre, à l'obscurité, il apparaît un mycélium blanc abondant capable de contaminer les fruits voisins (Bondoux, 1992).

Le champignon se conserve pendant l'hiver sous forme de sclérotes dans le sol ou dans les débris de plantes (Nair et al., 1995). Les sclérotes ne sont pas directement infectieux mais ils produisent du mycélium qui portera des conidiophores et des conidies (Figure 1) (Agrios, 1978). Celles-ci sont transportées dans les caisses de stockage par l'intermédiaire des débris du sol ou de tout autre matière organique. Elles sont également présentes dans l'eau utilisée pour le traitement des fruits avant leur stockage. L'interaction du champignon et le fruit commence par l'attachement des conidies à la surface de l'hôte qui induit la sécrétion d'une matrice extracellulaire (Doss, 1999). *B. cinerea* pénètre généralement dans le tissu de l'hôte à travers les blessures ou les ouvertures naturelles, mais il peut également pénétrer la cuticule par la dégradation enzymatique, comme dans le cas de la tomate et du raisin (Leone et al., 1990 ; Cotora et Silva, 2005). Il peut produire les cutinases, les pectines (comme la pectine lyase), différents polygalacturonases et les protéases (Leone, et al., 1990 ; Movahedi et Heale, 1990 ; Rha et al., 2001 ; Cotora et Silva, 2005). L'infection s'effectue par l'intermédiaire des hyphes en croissance ou du tube germinatif des conidies (Verhoeff, 1980). Une fois établie dans la blessure, *B. cinerea* se développe et les fruits atteints durant la conservation peuvent produire à leur tour une source d'inoculum en constituant ce qu'on appelle un « nid de pourriture » et occasionner la perte de nombreux fruits avoisinants.

Figure 1 : Cycle de développement de *B. cinerea* (Agrios, 1978)



III- Méthodes actuelles de lutte contre les maladies de post-récolte des pommes

La lutte contre les pathogènes des pommes en conservation s'appuie de façon prophylactique sur des précautions à prendre à la cueillette, au moment des opérations précédant l'entreposage et au cours du conditionnement. Elle passe également par la prévention de l'infection, et par l'éradication des infections installées (Bondoux, 1992).

III.1- Méthodes prophylactiques

Plusieurs opérations sont recommandées pour prévenir l'importance de l'incidence des maladies de post-récolte des pommes. Leur objectif général est de maîtriser les facteurs influençant l'état physiologique et sanitaire des fruits lors de la récolte et du stockage.

Etant des fruits climactériques, les pommes présentent une forte augmentation de la respiration juste avant la maturation (point climactérique) qui les rendent plus sensibles à certains pathogènes de post-récolte. Ainsi, les fruits destinés au stockage doivent être récoltés avant ce point climactérique. Les fruits préclimactériques sont habituellement plus durs que les fruits matures et par conséquence plus résistants aux blessures mécaniques survenant lors des opérations de récoltes (Sommer, 1982). Il est également très important d'éviter au maximum les blessures des fruits pendant les opérations de récolte, de triage et de transport et d'autant plus de ne pas mélanger les fruits tombés ou blessés avec les autres dans les mêmes caisses.

Après la cueillette, la maturation des pommes s'accélère. Les pommes mûrissent d'autant plus rapidement que la température est élevée. C'est pourquoi les pommes doivent être refroidies aussi rapidement que possible (DeEll et Murr, 2003). Les chambres froides à des températures comprises entre 0 et 4°C ont d'abord été utilisées dans ce but. Mais cette conservation à l'air maintient une quantité d'oxygène qui permet une évolution de la respiration des fruits. Dès lors l'utilisation d'atmosphères contrôlées (AC), où le taux d'oxygène faible (2 à 3%) réduit la respiration et les activités métaboliques, a représenté un progrès important. Cependant l'enrichissement de ces chambres en dioxyde de carbone (2 à 5%) peut poser parfois des problèmes de sensibilité liés à la variété, à l'âge des fruits et même à l'origine de la récolte (Marcellin, 1990). Actuellement, les nouvelles chambres de conservations ULO (Ultra Low Oxygen) sont pourvues d'un système de régulation permettant d'obtenir simultanément de très faibles teneurs en oxygène et en dioxyde de carbone (1 à 1,5%). Les principaux avantages de ces ULO sont le meilleur maintien de la fermeté des tissus des pommes et la prolongation de leur conservation (7 à 9 mois). Par conséquent une réduction du risque de blessure des fruits est obtenue. Au Maroc, l'activité de conservation des fruits est essentiellement assurée par de simples unités frigorifiques (251 unités d'une capacité de 250 000 T). Il existe également quelques chambres à atmosphère contrôlée (il y a actuellement 6 unités) (MADRPM, 2000). À côté de ces méthodes modernes, il existe encore

d'autres méthodes traditionnelles comme le stockage dans les caves et les grottes, le stockage au champ et le stockage au magasin. Ces dernières méthodes ne permettent pas une conservation de longue période (maximum 2 mois) et augmentent ainsi le risque d'attaque par les maladies de post-récolte (Rapport PIC 2004, données non publiées).

Concernant les pratiques sanitaires, elles ont pour objectif la réduction au maximum de l'inoculum primaire des spores des pathogènes. Ceci comprend la réduction de la contamination des caisses par les débris du sol qui constitue un réservoir des spores, la désinfection des caisses contaminées, le changement fréquent des solutions des eaux de lavage et de drencher (Janisiewicz, 1999 ; Sanderson, 2000). En Australie, la désinfection des caisses est fréquemment réalisée, avant la récolte, en utilisant l'eau chaude avec pression, un désinfectant ou la solarisation. Le traitement des eaux avec les sels d'hydrochlorure de calcium (à raison de 100 ppm) est également recommandé en Argentine pour éradiquer rapidement les pathogènes (Sanderson, 2000).

III.2- Traitements chimiques

Les fongicides synthétiques peuvent être appliqués en pré- ou en post-récolte.

Les traitements de pré-récolte sont préventifs et sont appliqués à intervalle régulier depuis la floraison jusqu'à la cueillette. Les restrictions imposées par chaque pays limitent le choix des fongicides appliqués. Selon la législation française, les substances utilisées actuellement dans les traitements en pré-récolte sont Fludioxonil 50% (famille de phényl-pyrroles), Thiophanat-méthyl 450g/l (famille de benzimidazoles) et un composé de Pyraclostrobine 128 g/kg + Boscalid (510) 252 g/kg (famille des morpholines). Chaque produit peut être appliqué deux fois maximum avec un intervalle supérieur à 7-10 jours et un délai avant récolte de 3 ou 7 jours (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2008). En Belgique, plusieurs produits ne sont plus autorisés sur pommier dernièrement, tel que des produits à base de Benomyl et de Tolyfluanide (Communiqué de presse, 2003, 2007a). Actuellement seuls les produits à base de Captane sont agréés sur pommier avec un délai avant récolte de 21 jours (Communiqué de presse, 2007b). Au Maroc, deux produits sont homologués pour les traitements en pré-récolte, ils sont à base de Carbendazime 50% et de Tolyfluanide 50% (AMPP, 2006).

La famille des benzimidazoles (benomyl, thiabendazole, carbendazime) a de moins en moins d'efficacité vis-à-vis de *B. cinerea* (souches résistantes généralisées). Un nombre croissant de souches de *Gloeosporium* spp. (Agent de pourritures lenticellaires de pommes) et de *P. expansum* résistantes apparaissent également pendant ces dernières années (Spotts et Cevantes, 1986 ; Stehmann et de Ward, 1996 ; Errampalli et al., 2005 ; Lima et al., 2006). Ainsi, dans une optique de mise en œuvre d'une stratégie d'anti-résistance aux fongicides, il est recommandé d'alterner les différentes familles de fongicides unisites (bensimidazoles) et d'y associer quelques traitements multisites tels que le thirame, le captane ou tolyfluanide. Des recherches récentes ont montré qu'un traitement avec un mélange de Boscalid (famille de anilides-carboxamides) et de pyraclostrobine (famille de morpholine), appliqué 2 semaines avant la récolte a permis un contrôle efficace de *B. cinerea* et de *P. expansum* sans avoir recours aux traitements de post-récolte (Xiao et Boal., 2009).

En post-récolte, le choix d'un traitement fongicide est surtout influencé par la problématique de résidus engendrés, pour lesquels la législation varie considérablement d'un pays à un autre. En France, les seuls fongicides autorisés sur les pommes en post-récolte sont à base de Thiabendazole (TBZ) (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2008). Le Philabuster 400 SC qui est à base d'Imazalil et Pyrimethanil est le seul pesticide agréé en Belgique. Il est appliqué au maximum une seule fois, dans les 16 heures qui suivent la récolte (Communiqué de presse, 2008). Au Maroc, deux fongicides de la famille des benzimidazoles (carbendazime, thiophanate méthyle) sont généralement utilisés en traitement des pommes en post-récolte (Rapport PIC 2004, données non publiées). Des recherches au Maroc ont montré que le traitement des pommes par trempage dans l'azoxystrobine qui est de la famille de la strobilurine réduit considérablement les pourritures de post-récolte (Attrassi et al., 2005). Sur poires, les traitements avec le pyrimethanil et le fludioxonil ont montré une grande efficacité vis-à-vis des pourritures de post-récolte. Ces deux produits ont été enregistrés pour être appliqués, notamment aux Etats-Unis (Vostermans et al., 2005 ; Sugar, 2008 ; Li et Xiao, 2008).

III.3- Thermothérapie

Le traitement à la chaleur des fruits peut être réalisé par trempage dans l'eau chaude, par la vapeur ou par l'air chaud (Bollen et Dela Rue, 1999). Le traitement des fruits avec un

système d'eau à haute pression permet d'éradiquer ou de retarder le développement de plusieurs infections de post-récolte mais essentiellement les infections latentes dues aux *Gloeosporium spp.* (Spotts et al., 2006). Les trempages à l'eau chaude (10 minutes à 45°C) inactivent les infections latentes des agents de pourritures lenticellaires de pommes occasionnées par *Gloesporium sp.*, mais accroît la sensibilité aux pathogènes de blessure, comme *P. expansum* et *B. cinerea* (Jijakli et al., 1999). Dans ce contexte, le traitement en thermothérapie est souvent testé en combinaison avec d'autres méthodes de lutte chimique ou biologique (Jijakli et al., 1999 ; Janisiewicz,et al., 2003 ; Leverenz et al., 2003 ; Spadaro et al, 2004 ; Conway et al., 2004 ; 2005 ; Zhang et al., 2007b)..

Le traitement à l'eau chaude présente l'avantage d'un coût faible, d'un appareillage peu coûteux et de l'absence de résidus toxiques. Cependant, son irrégularité d'action et sa différence d'efficacité sur les spores et le mycélium d'un même pathogène ou de pathogènes différents posent un problème important pour qu'il soit appliqué dans la pratique (Bondoux, 1992).

III.4- Nouvelles technologies pour le contrôle des maladies en conservation

Les maladies de post-récolte sont largement contrôlées par l'application des fongicides synthétiques. Cependant, la progression des pertes d'efficacité de ces fongicides à cause de l'apparition des souches de pathogènes résistantes (Spotts et Cervantes, 1986 ; Stehmann et Ward, 1996 ; Errampalli et al., 2005), la détection de résidus sur les denrées alimentaires et le retrait de l'agrémentation de certains fongicides efficaces destinés à cet usage (Lennox et Spotts, 2003) ont motivé la recherche d'autres méthodes alternatives et intégratives.

III.4.1- Induction de la résistance des fruits

La résistance induite semble être une méthode intéressante pour la protection des fruits en conservation, vu qu'elle semble moins毒 que les fongicides (Wilson et al., 1994). Il serait possible de conférer une résistance aux fruits en les traitant avec des souches avirulentes, ou des éliciteurs capables d'activer des chitinases, des glucanases, des peroxydases ou encore en les traitant avec des inhibiteurs de protéases dans des cellules

végétales éloignées du site d'application du stimulus (résistance induite systémique) (Wilson et al., 1994; Terry and Joyce, 2004; Walters et al., 2005). Comme exemples des éliciteurs qui sont efficaces dans l'induction de résistance contre les pathogènes de post-récolte, on cite les levures antagonistes (exp. *Candida oleophila* et *C. saitoana*), le chitosan, l'acide ?-aminobutyrique, le silicate de sodium, l'acide salicylique et le traitement par la lumière ultraviolette (Vero et Mondino, 1999 ; De Capdeville et al., 2002; Droby et al., 2002; El Ghaouth et al., 2003; Porat et al., 2003; Molloy et al., 2004 ; Bi et al., 2006 ; Cao et al., 2006).

III.4.2- Transformation génétique de la plante hôte

La transformation génétique des plantes permet d'accroître directement leur résistance aux maladies ou de l'augmenter indirectement en modifiant le processus de maturation, de respiration ou de sénescence (Arul, 1994). Plusieurs équipes de chercheurs ont essayé d'améliorer la résistance de certaines variétés de pommes à la tavelure (*Venturia inequalis*) en introduisant des gènes antifongiques (surexpression des chitinases) à partir de *Trichoderma harzianum* (Wong et al., 1999 ; De Bondt et al., 1999 ; Bolar et al., 2000). Cependant, l'apparition de nouvelles souches virulentes a interrompu cette résistance chez une variété de pomme « Ariane », ce qui a poussé à développer le concept de combinaison de mécanisme antifongique transgénique avec un gène de résistance naturel qui provient des pommes (Faize et al., 2004).

III.4.3- Biocides naturels

Des études ont montré que certains métabolites secondaires produits par les plantes, comme les huiles essentielles et les composés volatils, peuvent avoir une action biocide contre les pathogènes de post-récolte (Fallik et Grinberg, 1992 ; Wilson et al., 1997 ; Deferera et al., 2000). Bompeix et al. (2000) ont étudié l'effet de l'utilisation des produits naturels tels que la carvone (extrait de la menthe) et l'eugénol (extrait des clous de girofle) sur les maladies fongiques des pommes en post-récolte. Ils ont montré qu'ils peuvent être efficaces mais en utilisant des concentrations élevées, ce qui peut constituer un obstacle au niveau économique pour leur mise en marché. Des composés aromatiques volatiles, produits des fruits durant la

maturation comme l'acétaldéhyde, peuvent aussi avoir des activités fongicides ou fungistatiques (Mari et Guizzardi, 1998).

III.4.4- Utilisation des agents de contrôle biologique

La lutte biologique grâce à l'utilisation de microorganismes antagonistes apparaît comme une alternative ou un complément prometteur à l'utilisation des fongicides synthétiques. Cependant, par rapport au nombre de molécules de synthèse homologuées dans le monde, le nombre d'agents de lutte biologique homologués pour le contrôle des maladies reste insignifiant (1 à 2 % de marché) (Jijakli et Lepoivre, 1995). Les limites qui freinent le développement de la lutte biologique quelle que soit la culture à protéger sont (1) l'efficacité ou le maintien de celle-ci pendant une période suffisamment longue, (2) la possibilité d'une production à grande échelle et (3) la rentabilité économique d'une telle lutte. Ainsi, les marchés ciblés pour le développement de la lutte biologique doivent être bien définis, privilégiant ceux où la réglementation en matière de lutte chimique est plus restrictive.

IV- Potentiels de lutte biologique sur fruits en conservation

Le domaine de la conservation présente des caractères propres favorables au développement et à la mise en œuvre des stratégies de contrôle biologique. Les exigences nouvelles du consommateur et la législation stricte au niveau de la lutte chimique suscitent chez les professionnels un intérêt croissant pour les méthodes alternatives de lutte contre les agents des pourritures de conservation. En outre, les produits de post-récolte présentent une haute valeur ajoutée qui permet de supporter les coûts parfois élevés d'un traitement biologique (Fokkema, 1991). Contrairement au traitement au champ, les sites d'application des agents de contrôle biologique sont limités aux fruits. D'autant plus que les conditions environnementales de conservation sont contrôlées et stables au cours du temps (Jijakli et al., 1999). Ces caractéristiques aident à surmonter une des grandes limites du développement des produits biologiques qui est le manque d'efficacité en conditions pratiques malgré des résultats prometteurs obtenus au laboratoire.

Le processus de développement de la lutte biologique contre les maladies de post-récolte est confronté à des exigences biologiques, techniques, économiques et réglementaires imposées par l'industrie, l'utilisateur, le consommateur et les instances officielles d'homologation des produits phytosanitaires. Ainsi, un agent de lutte biologique « idéal » contre les maladies de conservation devrait posséder les caractéristiques suivantes (Jijakli, 2003):

- § Stabilité génétique,
- § Efficacité à faible concentration,
- § Faible exigence nutritionnelle,
- § Capacité de survie et d'adaptation aux différentes conditions environnementales,
- § Efficacité sur un grand nombre de pathogènes et d'hôtes,
- § Production aisée et peu coûteuse (production en masse),
- § Préparation facile et efficace de l'inoculum (produit formulé),
- § Résistance aux pesticides,
- § Compatibilité avec d'autres traitements,
- § Absence de production de métabolites secondaires toxiques,
- § Non pathogénique pour l'homme et éco-toxicologie acceptable.

La littérature a présenté plusieurs exemples de microorganismes antagonistes (champignons, bactéries et levures) qui se sont révélés actifs vis-à-vis des maladies de post-récolte (tableau 1). Actuellement, quatre produits à base de levures sont commercialisés :

- § Yield plus® qui contient une souche de *Cryptococcus albidus* (Sato) Skinner est utilisé contre *B. cinerea*, *P. expansum* et *Mucor* sp. sur pommes et poires (Droby et al., 2003). Il a été introduit dans le commerce par la société Anchor yeast en Afrique de Sud en 1997;
- § Shemer® à base de *Metchnikowia fructicola* est utilisé contre plusieurs pathogènes sur fraises, raisins, agrumes et patate douce (Ferrari et al., 2007). Ce produit a été récemment enregistré par Agro green en Israël.
- § Boni-Protect® qui contient deux souches d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud à une concentration de 5.10^9 UFC/g a été nouvellement développé par Bio-Protect et est agréé en Allemagne depuis Septembre 2005. Il est utilisé contre les maladies de post-récolte des pommes et particulièrement contre *P. expansum*, *B. cinerea* et *Gloeosporium* spp . (Weiss et al., 2006).

§ Boni-Protect® forte qui contient également des souches d'*A. pullulans* à une concentration de $7,5 \cdot 10^9$ UFC/g a été enregistré en Allemagne en Février 2007 par Bio-protect. Il est utilisé dans le contrôle de *B. cinerea* sur fraise et *Monilia* spp. sur cerises (Bio-protect, 2008).

Il existe également d'autres produits à base de la bactérie *Pseudomonas syringae* (Isolats ESC-10 et ESC-11) qui sont commercialisés sous le nom de Biosave® 100 et 110 (EcoScience) pour lutter contre *Penicillium*, *Botrytis* et *Mucor* sur pommes, poires et citrus (Droby et al., 2003).

Tableau 1: Exemples d'agents antagonistes actifs vis-à-vis des maladies de post-récolte

Nature de l'antagoniste	Antagonistes	Plantes hôtes	Pathogènes cibles	Mode d'action supposé ou démontré	Références
Champignon filamenteux	<i>Alternaria strictum</i>	Banane	<i>Colletotrichum musae</i>	*	Ragazzi et Turco., 1997
	<i>Trichoderma harizianum</i>	Pomme	<i>P. expansum</i>	*	Batta, 2004
Bactérie	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tomate	<i>B. cinerea</i>	*	Mari et al., 1996
	<i>Bacillus subtilis</i>	Citrus	<i>Penicillium</i> sp.	*	Obagwu et Korsten, 2003
	<i>Erwinia</i> sp.	Pomme	<i>B. cinerea</i>	*	Dock et al., 1998
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pomme Poire	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	Antibiose (Pyrrolnitrine)	Janisiewicz, 1991
	<i>P. syringae</i>	Citrus	<i>P. digitatum</i> <i>P. italicum</i>	Antibiose (syringomycine)	Bull et al., 1998
		Pomme	<i>P. expansum</i>	*	Errampalli et al., 2006
	<i>P. fluorescens</i>	Pomme	<i>B. mali</i>	Antibiose	Mikani et al., 2008
	<i>Pantoea agglomerans</i>	Fruits à noyaux	<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Monilia laxa</i>	Mycoparasitisme	Bonaterra et al., 2003
		Citrus	<i>P. digitatum</i>	*	Canamas et al., 2008
Levure	<i>Rahnella aquatilis</i>	Pomme	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	Mycoparasitisme	Calvo et al., 2007
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomme	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i> <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Gloeosporium</i> spp.	Compétition pour la nutrition- Mycoparasitisme (β -1,3-glucanase) Induction de la résistance	Castoria et al., 2003 ; Janisiewicz et al., 2000 ; Ippolito et al., 2000 ; Weiss et al., 2006
		Fraise	<i>B. cinerea</i>	Compétition pour la nutrition	Lima et al., 1997
		Merise	<i>R. stoonifer</i> <i>B. cinerea</i>	Antibiose	Ippolito et al., 2005
	<i>Candida oleophila</i>	Tomate	<i>B. cinerea</i>	Compétition pour la nutrition	Saligkarias et al., 2002
		Fraise	<i>B. cinerea</i> <i>R. stoonifer</i>	Compétition pour la nutrition Antibiose	Lima et al., 1997

	<i>Candida sake</i>	Pomme	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i> <i>Ruinous Nigerians</i>	Compétition pour la nutrition Compétition pour l'espace	Vinas et al., 1998 ; Usall et al., 2001 ; Morales et al, 2008
	<i>Cryptococcus humicoles</i>	Pomme	<i>B. cinerea</i>	Compétition pour la nutrition et pour l'espace, antibiose	Filonow et al., 1996
	<i>Cryptococcus albidus</i>	Pomme, poire	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i> <i>Mucor spp.</i>	*	Droby et., 2003
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Pomme	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i>	Compétition pour la nutrition Mycoparasitisme	Castoria et al., 1997 ; Vero et al, 2002
	<i>Pichia anomala</i>	Poire	<i>P. expansum</i>	Mycoparasitisme	Yu et al, 2008
		Pomme	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i>	Compétition pour la nutrition et pour l'espace Mycoparasitisme	Jijakli et Lepoivre, 1998 ; De Clercq et al, 2003
	<i>P. guillermondii</i>	Pomme Tomate	<i>B. cinerea</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	Mycoparasitisme Compétition pour la nutrition et pour l'espace	Droby et al. , 1993 ; Zhao et al, 2008
	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	Pomme	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	Compétition pour la nutrition et pour l'espace, antibiose	Filonow et al., 1996
	<i>Rhodoturula glutinis</i>	Pomme	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	Compétition pour la nutrition Mycoparasitisme	Castoria et al., 1997 ; Sansone et al, 2005
		Fraise	<i>B. cinerea</i>	(β -1,3-glucanase)	Zhang et al, 2007a
	<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	Pomme	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i> <i>Alternaria alternata</i>	Compétition pour le fer	Saravanakumar et al, 2008 ; Spadaro et al, 2008

* = Non déterminé ou non précisé

V- Les modes d'action des agents antagonistes

V.1-Importance et difficultés

La détermination des modes d'action des agents antagonistes revêt une importance cruciale pour réussir le développement d'une stratégie de contrôle biologique efficace en post-récolte, car elle contribue à :

§ Développer une procédure de sélection d'une deuxième génération de souches efficaces ou à améliorer génétiquement les souches déjà sélectionnées en tenant compte des mécanismes d'action impliqués dans la protection,

- § Développer des formulations adéquates qui permettent de stimuler l'expression de l'antagonisme et donc qui pourront augmenter l'efficacité de l'agent de biocontrôle,
- § Optimiser la méthode et le moment d'application des antagonistes,
- § Contrôler la qualité de la production du biopesticide à l'échelle commerciale,
- § Répondre aux exigences du dossier technique d'homologation établie par la directive 2001/36/CE (Droby & Chalutz, 1994)

Cependant, nos connaissances sur les modes d'action restent très limitées à cause des relations complexes entre l'antagoniste, la plante hôte, le pathogène et la microflore présente à la surface de la plante (Jijakli et al., 2001). Ces interactions sont souvent étudiées *in vitro* pour limiter le nombre de facteurs intervenants, mais leur interprétation est alors délicate car la concordance entre les mécanismes d'action intervenant *in vitro* et la protection observée *in vivo* n'est pas toujours vérifiée. Ainsi, l'identification d'un mécanisme *in vitro* peut orienter la recherche du mécanisme *in vivo* mais ne le démontre pas.

V.2- Les principaux modes d'action

L'activité antagoniste peut s'exprimer à travers un ou plusieurs mécanismes d'action. Les plus couramment cités sont la compétition pour l'espace et pour les éléments nutritifs, le mycoparasitisme (avec entre autre la production d'enzymes lytiques), l'antibiose et l'induction de résistance chez la plante hôte.

V.2.1- Antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques est un phénomène très commun dans la nature. De nombreux microorganismes produisent ces métabolites et agissent en provoquant une altération de la germination, de la croissance et/ou de la sporulation du pathogène, une distorsion des hyphes du pathogène, une modification de l'aspect des colonies et une production de formes spécifiques comme les pseudoparenchymes (Campbell, 1989). Une étude récente a montré que le filtrat de culture de l'antagoniste *T. harzianum* peut complètement inhiber la germination et causer des gonflements au niveau des conidies des pathogènes responsable de la pourriture du collet du bananier par le mécanisme d'antibiose

(Alvindia et Natsuaki, 2008). Madrigal et Melgarejo (1994) ont montré que la flavigipine, un antibiotique sécrété par *Epicoccum nigrum*, agit vis-à-vis de *Monilia laxa* (agent de la pourriture brune du pêcher) par une action multisite en inhibant la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP et de protéines. De plus, la capacité de pénétration des substances antibiotiques permet d'obtenir une protection contre les infections qui ont lieu avant l'application de l'agent antagoniste (Droby et Chalutz, 1994), leur conférant une action curative.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence la production *in vitro* d'antibiotique par les agents de lutte biologique. Cependant, cela ne signifie pas toujours une production au niveau du site d'action *in situ* ni que l'antibiotique intervienne en totalité ou en partie dans l'antagonisme (Droby et Chalutz, 1994). Ainsi, l'étude du mécanisme de l'antibiose *in vitro* permet d'orienter la recherche *in vivo* sans la démontrer.

Selon la littérature, les approches expérimentales suivantes ont été réalisées :

§ L'étude *in vitro* de l'inhibition du diamètre de la colonie du pathogène et la formation d'une zone d'inhibition lorsqu'il est mis en culture duale avec l'antagoniste ou son filtrat de culture sur milieu solide sur boîte de Pétri (Castoria et al., 1997 ; Calvo et al., 2007 Saravanakumar et al., 2008 ; Mikani et al., 2008).

§ L'étude *in vitro et in vivo* de l'inhibition de la germination des spores du pathogène ou de la croissance mycélienne en présence du filtrat de culture de l'antagoniste, d'une suspension contenant les cellules de l'antagoniste tuées à la chaleur ou des cellules vivantes de l'antagoniste (Guetsky et al., 2002 ; Spadaro et al., 2002 ; Calvo et al., 2007 ; Zhang et al., 2007a ; Alvindia et Natsuaki, 2008 ; Mikani et al., 2008). Wilson et Wisniewski (1989) ont ainsi montré que les symptômes de la pourriture verte (*P. digitatum*) des citrons en conservation pouvaient être réduits par des applications de *Bacillus subtilis* ou de son filtrat de culture contenant un lipopeptide (Iturine) sécrété par cette bactérie.

§ L'étude de l'activité antifongique des composés volatiles sécrétés par l'agent antagoniste *in vitro* et leur effet sur l'inhibition de la croissance de champignon pathogène (Fiddaman et Rossal, 1993 ; Mikani et al., 2008). Mikani et al., (2008) ont remarqué une activité des composés volatiles sécrétés par *Pseudomeunas fluorescens* sur l'inhibition de la croissance de *Botrytis malii* quand ils ont été cultivés dans deux boîtes de PDA enveloppées ensemble avec du parafilm.

§ La production et la purification de l'antibiotique *in vitro* et *in vivo*, son identification et l'étude de la relation entre la production de cet antibiotique et l'activité protectrice *in vivo*. Bull et al. (1998) ont pu isoler et purifier un antibiotique (la syringomycin E) *in vitro* à partir de deux souches de *Pseudomonas syringae*. Ce composé a permis de contrôler la pourriture grise des citrons avec un niveau similaire à *P. syringae*.

§ Une autre approche, basée sur l'analyse cytochimique et ultrastructurale par microscopie électronique, a permis de mieux comprendre le processus d'antibiose. Dans leur étude, Benhamou et Brondeur (2000) se sont intéressés à déterminer le mécanisme d'action de *Verticillium lecanii* vis-à-vis de *Penicillium digitatum*, l'agent causal de la pourriture verte sur agrumes. Ils ont pu constater par cette analyse que *V. lecanii* agit en déclenchant un processus multifacial dont l'antibiose et l'altération structurale des hyphes de l'hôte semblent être les clés de l'action antagoniste.

§ Il existe également une approche moléculaire permettant de mettre en évidence le rôle de l'antibiotique dans les propriétés antagonistes d'une souche productrice en faisant la comparaison avec les propriétés antagonistes d'une souche mutée ne produisant pas l'antibiotique et d'une souche complémentée chez laquelle il y a eu restauration de la synthèse de l'antibiotique (Larkin et al., 1998).

Les antagonistes producteurs d'antibiotiques ont montré une grande efficacité dans le contrôle biologique. Cependant, leur utilisation comme agent de lutte biologique a été remise en question. L'introduction de ces organismes dans l'alimentation peut constituer une cause d'apparition de résistance à certains antibiotiques chez l'homme et/ou de toxicité directe vis-à-vis de l'homme. De plus, la pression de la sélection exercée par les substances antibiotiques sur les agents phytopathogènes risque d'entraîner le développement de souches pathogènes résistantes, qui pourraient apparaître par simple mutation (Droby et Chalutz, 1994, Spadaro et Gullino, 2003). Ainsi, avant de pouvoir utiliser les antagonistes producteurs d'antibiose, plusieurs facteurs doivent être pris en considération, entre autre la détermination de l'implication de l'antibiotique dans le mode d'action de l'antagoniste, la connaissance des facteurs qui peuvent intervenir sur le mode d'action de cet antagoniste, l'étude du spectre d'action de l'antibiotique et son effet sur d'autres espèces que la cible ainsi que sur la santé humaine (Droby et Chalutz, 1994).

V.2.2-Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme est une relation trophique qu'établit un microorganisme au détriment d'un champignon. La chitine et le β -1,3-glucan (laminarine) sont les principaux constituants de la paroi de la plupart des champignons (Bartnicki-Garcia, 1968). Ainsi les agents antagonistes produisant les enzymes lytiques comme la glucanase et la chitinase, qui dégradent les parois du pathogène, ont comme mécanisme d'action le parasitisme. Dans le cas des maladies foliaires et du sol, le contrôle biologique par des agents développant des propriétés mycoparasitiques a été largement rapporté. Parmi ces antagonistes, les *Trichoderma* spp. sont les plus étudiés (Tronsmo & Raa, 1977 ; Bélanger et al., 1995 ; Carsolio et al., 1999 ; Chet et al., 1998 ; Lorito, & Woo, 1998).

Le processus d'intervention des antagonistes par mycoparasitisme est très complexe et peut se produire en plusieurs étapes successives qui sont généralement très spécifiques à l'espèce du pathogène (Chet et al., 1998). Certains champignons et levures antagonistes ont la capacité d'adhérer spécifiquement aux hyphes et aux conidies des champignons pathogènes avant de produire les enzymes lytiques. Il a été suggéré qu'un fort attachement des cellules de l'antagoniste peut stimuler l'activité de tous les composés extracellulaires possédant une action enzymatique ou antibiotique (Cook et al., 1997). Cependant, d'autres études ont montré que c'est la production des enzymes lytiques par les cellules des antagonistes en présence du pathogène qui améliore la capacité de celles-ci à s'attacher aux hyphes du pathogène (Wisniewski et al., 1991 ; Chan et Tian, 2005).

Afin d'étudier le mécanisme de mycoparasitisme et l'implication des enzymes hydrolytiques dans l'activité antagoniste des agents de contrôle biologique, une approche biochimique a été utilisée dans les conditions *in vitro* et *in vivo*. Elle consiste à étudier la production des enzymes hydrolytiques par les agents de contrôle biologique et l'impact de ces enzymes purifiées sur l'activité antifongique vis-à-vis du pathogène (Jijakli et Lepoivre, 1998 ; Chan et Tian, 2005). Il a été observé une stimulation de l'activité exo- β -1,3-glucanase *in vitro* à partir des filtrats de culture de *P. anomala* souche K en présence des parois de *B. cinerea*. L'enzyme purifiée à partir de ces filtrats de culture a montré un effet inhibiteur de la croissance des tubes germinatifs, ainsi que des modifications morphologiques des cellules de *B. cinerea*. L'activité exo- β -1,3-glucanase a également été mise en évidence dans l'eau de rinçage des pommes traitées avec la souche K. L'addition de parois de *B. cinerea* stimulait à la fois cette activité enzymatique et l'activité protectrice vis-à-vis du pathogène. Ces résultats

suggéraient que l'activité enzymatique pourrait être l'un des mécanismes d'action impliqués dans l'effet protecteur de *P. anomala* souche K vis-à-vis de *B. cinerea* (Jijakli et Lepoivre, 1998). Par ailleurs, Lorito et Woo (1998) ont purifié la glucan-1,3-?-Glucosidase et la *N*-Acetyl-?-Glucosaminidase à partir de filtrat de culture de *T. harzianum* souche P1. Ces enzymes ont eu un important effet inhibiteur de la germination et de l'élongation du tube germinatif des conidies de *B. cinerea*.

Outre cette approche biochimique qui suggère le parasitisme sans apporter une démonstration formelle, la stratégie de disruption des gènes responsables des activités lytiques a également été adoptée. Elle consiste à inactiver le gène codant pour l'enzyme par insertion d'un plasmide au niveau du gène cible et à tester l'effet de la souche mutante sur le biocontrôle. Grevesse (2001) a étudié le rôle de deux exo- β -1,3-glucanases dans la relation antagoniste de *P. anomala* souche K vis-à-vis de *B. cinerea*. Deux gènes codant pour les exo- β -1,3-glucanases ont été isolés à partir d'une banque génomique de l'antagoniste. L'analyse des propriétés biologiques des souches mutantes dont l'un des deux gènes a été disrupté a montré que chacune des deux exo- β -1,3-glucanase ne joue pas seule un rôle majeur dans l'activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea*. Cependant, par la suite, Friel et al. (2007) ont montré que des souches mutantes de *P. anomala* (souche K) dont les 2 gènes codant pour l'exo-?-1,3-glucanase ont été disruptés ont perdu une partie de leur activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea* quand celui-ci a été inoculé à une faible densité dans les blessures des pommes. Ce qui a suggéré l'implication de l'exo-?-1,3-glucanase dans l'activité de biocontrôle de la souche K. Néanmoins, dans certaines conditions (haute densité cellulaire de l'antagoniste), ce mécanisme peut être masqué par d'autres modes d'action comme la compétition.

V.2.3-Induction de résistance chez l'hôte

Le tissu végétal des plantes réagit à une attaque de pathogènes par l'activation d'un système de défense biochimique et structurale qui contribue à éviter la dissémination du pathogène (Kloepper et al., 1992 ; Sticher et al., 1997). L'induction du mécanisme de résistance de l'hôte peut s'exprimer par l'accumulation de métabolites antifongiques (phytoalexines) ou des glucanohydrolases antifongiques comme la chitinase, le chitosan et

une ?-1, 3-glucanase (Giovanni, 1996; Hammerschmidt & Kuc, 1995 ; Kloepfer et al., 1992 ; Yao et Tian, 2005 ; Tian, et al., 2007).

Dans le cas des maladies de post-récolte, plusieurs études ont montré que certains antagonistes peuvent établir des interactions, particulièrement avec les tissus blessés, qui permettent d'accélérer les processus de cicatrisation et d'induire les processus de résistance chez l'hôte (Droby et Chalutz, 1994). Le traitement des pommes avec *Candida saitoana* induit une résistance systémique vis-à-vis de *B. cinerea* qui semble être corrélée avec l'augmentation de l'activité de chitinase et β -1,3-glucanase (El Ghaouth et al., 2003). Cependant, cette étude n'a pas chiffré le niveau de protection entraînée par cette résistance systémique. Sur citrus, la présence de l'antagoniste *A. pullulans* stimule la production de β -1,3-glucanase, de chitinase et de peroxidase par l'hôte (Ippolito et al., 2000). L'application de *Pichia guillermondii* ou *Candida oleophila* peut provoquer l'augmentation de la production d'éthylène chez l'hôte et l'accumulation de matériaux phénoliques dans les blessures de pamplemousses, de raisins ou de carottes (Droby et Chalutz, 1994 ; Droby et al., 2002). Par ailleurs, l'inoculation des fruits de tomate avec *P. guillermondii* a engendré des activités de peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chitinase (CHI) et ?-1,3-glucanase en corrélation avec une induction de résistance des fruits vis-à-vis de *Rhizopus nigricans* (Zhao et al., 2008). Aucune de ces études n'a cependant mis en évidence la part de protection apportée par ces phénomènes d'induction de résistance observés.

V.2.4- Compétition pour la nutrition et pour l'espace

La compétition peut être définie comme étant une demande active et simultanée d'une même ressource de la part de deux ou plusieurs organismes et conduisant à la restriction de la taille de la population ou de l'activité microbienne de l'un ou de plusieurs d'entre eux (Clarke, 1965). Ces ressources sont le plus souvent des éléments nutritifs, de l'oxygène ou d'espace.

La plupart des pathogènes des maladies de post-récolte sont nécrotropes et doivent présenter une phase saprophytique à la surface des fruits avant de développer une structure infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments provenant de la spore elle-même mais surtout de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface

(Blakeman et Brodie, 1977). La présence sur les sites de blessure d'antagonistes (bactéries, levures ou champignons) entrant en compétition pour ces éléments nutritifs, peut prévenir l'établissement de la phase saprophytique du pathogène et par conséquent prévenir ou réduire l'infection (Blakeman, 1985).

Pour être un compétiteur efficace, l'antagoniste doit posséder les caractères spécifiques suivants (Droby et Chalutz, 1994):

- § Coloniser rapidement les sites blessés,
- § Utiliser les éléments nutritifs présents en faible quantité dans le milieu plus rapidement et plus efficacement que le pathogène,
- § S'adapter aux conditions environnementales et nutritionnelles du site blessé,
- § Etre capable de survivre et de se développer sur la surface de fruit et sur le site d'infection sous des conditions de température, de pH et d'osmose extrêmes.

Ainsi, plusieurs études portant sur le contrôle biologique des maladies de post-récolte ont rapporté l'utilisation des microorganismes qui se multiplient rapidement, colonisent les blessures et qui sont compétitifs pour les nutriments et pour l'espace. A titre d'exemples, les levures *P. guillermondii*, *C. laurentii*, *A. pullulans*, *Candida* spp. et les bactéries *Enterobacter cloacea* et *P. cepacia* ont la capacité de coloniser rapidement et de manière efficace le site de blessures (Droby et al., 1989 ; Mercier & Wilson, 1995 ; Lima et al., 1997 ; Castoria et al., 1997 ; Janisiewicz et al., 2000 ; Castoria et al., 2001 ; Zhao et al., 2008).

La compétition pour le fer peut aussi jouer un rôle dans le biocontrôle des maladies de post-récolte. Elle a été observée dans le cas de *Rhodoturula glutinis* dans le contrôle de *P. expansum* et *B. cinerea* et de *Metschnikowia pulcherrima* (souche MACH1) vis-à-vis de *B. cinerea*, *Alternaria alternata* et *P. expansum* sur pomme (Calvente et al., 1999; Sasone et al., 2005 ; Saravanakumar et al., 2008). Ces antagonistes possèdent un mécanisme spécifique de captation des ions ferriques basé sur la production des sidérophores en condition de carence en fer. Ainsi, l'addition de sidérophores (l'acide rhodotorulique) à la suspension des antagonistes a augmenté le biocontrôle de la pourriture de pommes, tandis que l'addition de fer a diminué cette efficacité (Calvente et al., 1999).

D'autres approches utilisées pour étudier l'effet de la compétition dans le mode d'action des agents de lutte biologique sont décrites de manière plus détaillée dans le paragraphe VI de ce chapitre.

V.3- Utilisation de la biologie moléculaire pour la compréhension des mécanismes d'action

Les mécanismes d'action d'un agent de contrôle biologique sont difficiles à comprendre, et les stratégies telles que les observations microscopiques et les études biochimiques décrites précédemment ne permettent qu'une mise en évidence indirecte du mécanisme sans le démontrer complètement.

L'avènement des techniques de biologie moléculaire a offert une nouvelle gamme d'outils pour étudier ces mécanismes d'action (Massart et Jijakli, 2007). Parmi les techniques biomoléculaires existantes, deux grands axes sont disponibles :

§ D'une part, il y a les techniques qui visent l'étude des gènes spécifiques et l'implication des protéines correspondantes dans l'activité antagoniste d'un agent de lutte biologique. Ces techniques se basent sur la délétion d'un gène et l'analyse *in situ* de l'activité protectrice de la souche mutée ainsi que de la souche complémentée (chez laquelle il y a eu restauration de la production de la molécule) (Carsolio et al., 1999 ; Kang et al., 1998). D'autres protocoles moléculaires consistent à étudier les propriétés protectrices de souches transgéniques surexprimant un gène donné suite à son insertion en multicopie ou à sa fusion avec un promoteur d'expression fort (Kraus & Loper, 1995, Larkin et al., 1998, Jijakli, 2003). Cependant, ces techniques sont très ciblées et leurs conclusions ne concernent généralement que la molécule étudiée, sans prendre en compte l'existence d'autres mécanismes et le rôle joué par d'autres molécules.

§ D'autre part, il y a les techniques dites sans *a priori* qui permettent l'étude de l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans le mode d'action y compris les gènes de régulation. Elles ne nécessitent pas de connaissance préalable sur la ou les molécules impliquées dans le phénomène à étudier ni sur le génome de l'espèce étudiée. Ces techniques consistent à comparer des populations d'ARNm à partir de la souche antagoniste incubée dans un milieu permettant ou non l'expression des gènes de biocontrôle (par exemple la présence ou l'absence de l'agent pathogène). Parmi les méthodes moléculaires existantes, la *Random amplified polymorphism Polymerase Chain Reaction* (RAP-PCR) (*Random amplified polymorphism DNA* (RAPD) a été utilisée pour comparer les populations d'ARNm exprimées par *Candida oleophila* dans des milieux de YNB (Yeast Nitrogen Base) additionnés ou non de

l'acide galacturonique (GA), qui permet la stimulation *in situ* de l'activité protectrice de cette antagoniste (Dickburt et al., 2001). Il existe également la technique *differential display / reverse transcription polymerase chain reaction* (DD/RT-PCR). Elle a récemment permis d'identifier une protéase aspartyl à partir de *Trichoderma asperellum* (Viterbo et al., 2004). Cependant ces deux techniques ont des limites importantes comme le manque de reproductibilité, la difficulté de mettre en évidence des ARNm très rares et la génération de faux positifs (Gellatly et al., 2001). A l'opposé, la cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996) surmonte ces limites et permet une grande reproductibilité et spécificité (Gellatly et al., 2001). Dans une étude, l'utilisation de cette technique a permis d'identifier 11 gènes qui sont potentiellement impliqués dans l'activité de biocontrôle d'une souche Kh5 de *P. anomala* vis-à-vis de *B. cinerea*. Ces gènes ont montré une homologie avec des gènes de levure qui sont responsables de différentes fonctions, parmi lesquelles les activités de la β -glucosidase et de la citrate synthase, le transport transmembranaire et le transport externe des acides aminés (Massart et Jijakli, 2006).

§ Au cours de ces dernières années, plusieurs laboratoires ont commencé à utiliser l'analyse protéomique et l'analyse génomique fonctionnelle dans le domaine de la lutte biologique. Ceci dans le but d'obtenir une vue globale des changements qui se produisent durant l'interaction de l'agent antagoniste, du pathogène et de la plante hôte, en identifiant et en quantifiant les protéines qui sont différemment exprimées (Lim et al., 2001 ; Grinyer et al., 2005 ; Woo et al., 2006). Avec l'utilisation de cette technique, un grand nombre de protéines impliquées dans le processus de résistance aux maladies ont été identifiés dans des plants de tomates et de petits pois colonisés par *Trichoderma* spp. en présence ou en absence du pathogène. Ainsi, on a pu démontrer que *Trichoderma* sp. est capable de produire au moins trois types d'éliciteurs qui induisent un mécanisme de résistance chez les plantes : des enzymes ou peptides, des protéines AVR (protéines similaires à celles trouvées dans des pathogènes avirulents) et des oligosaccharides (Woo et al., 2006).

VI - Les approches méthodologiques utilisées pour l'étude du mécanisme de la compétition

L'implication de la compétition pour la nutrition et pour l'espace a été largement rapportée dans l'activité antagoniste des agents de contrôle biologique (ACB). Cependant il

n'existe pas encore de preuves directes démontrant l'importance de ce mécanisme dans le domaine du post-récolte (Calvente et al., 1999 ; Droby et al., 1989 ; Filonow ,1998 ; Janisiewicz et Marchi, 1992 ; Jijakli et al., 1993 ; Wisniewski et al., 1989). Il reste difficile de le démontrer expérimentalement, notamment à cause du caractère polygénique de ces propriétés nutritives et du fait qu'elles mettent en jeu des fonctions impliquées dans le métabolisme de base de ces microorganismes qui rend très difficile l'utilisation de certaines approches moléculaires comme la délétion des gènes (Jijakli, 2003).

Par contre, plusieurs auteurs ont considéré que les observations suivantes permettent de suggérer fortement l'implication de ce phénomène dans l'activité antagoniste d'un ACB (Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Droby et al., 1989 ; Droby & Chalutz, 1994 ; Filonow et al., 1996 ; Guinebretiere et al., 2000 ; Janisiewicz et al. 2000 ; Lima et al., 1997 ; Mercier et Wilson, 1994 ; Vero et al., 2002 ; Zhang et al., 2007a ; Zhao et al., 2008) :

- § L'importance de la colonisation du site à protéger par l'ACB sur son activité antagoniste ;
- § Une meilleure consommation des éléments nutritifs du milieu par l'ACB par rapport au pathogène et sa corrélation avec une meilleure inhibition du pathogène ;
- § Inhibition du pathogène durant la co-culture avec l'antagoniste dans un milieu limité en éléments nutritifs ;
- § Une suppression totale ou partielle de l'effet antagoniste après ajout d'un excès de substances nutritives ;

Afin de mettre en évidence ces observations, plusieurs approches expérimentales ont été réalisées dans les conditions *in vitro* et *in vivo*.

VI.1- Etude de l'effet de colonisation de l'antagoniste sur le biocontrôle

La croissance rapide et la colonisation extensive du site de blessure par l'antagoniste sont des facteurs importants qui entravent l'établissement du pathogène dans les blessures. Elles peuvent intervenir dans la réduction des éléments nutritifs disponibles dans le milieu ou dans la restriction de l'espace pour la colonisation du pathogène, ce qui réduit la croissance de ce dernier et l'incidence de son infection (Droby et Chalutz, 1994).

L'effet de la colonisation de l'agent antagoniste sur le biocontrôle a été évalué en étudiant la relation entre l'accroissement des populations antagonistes et le niveau de protection en fonction du temps d'incubation qui sépare les applications de l'antagoniste et du pathogène (Filonow et al., 1996 ; Jijakli et Lepoivre, 1993). Dans la plupart des cas, les auteurs ont remarqué que l'application de l'antagoniste avant l'infection du pathogène est nécessaire pour assurer une meilleure colonisation et un taux maximal de protection (Droby et al., 1989 ; Filonow et al., 1996 ; Jijakli et Lepoivre, 1993 ; Zhao et al., 2008).

Une autre approche expérimentale consiste à comparer le nombre de cellules qui forment une monocouche dans la blessure et la densité cellulaire nécessaire pour atteindre un taux élevé de protection. Dans une étude, il a été remarqué que la plupart des isolats de levures testés pouvaient assurer une protection vis-à-vis de *B. cinerea* sur pomme quand ils sont appliqués à une densité de 5.10^6 UFC/blessure. Cette même densité pouvait complètement occire la surface de la blessure en formant une monocouche par des cellules arrangées l'une à côté de l'autre (Filonow, et al. 1996).

L'importance de la croissance rapide d'un agent de contrôle biologique sur son activité antagoniste a été montrée en utilisant une approche moléculaire qui consiste à analyser la cinétique de croissance d'une souche mutante qui a perdu son activité de biocontrôle. Après application d'une souche mutante de *P. guillermondii* à une densité élevée de 10^{10} UFC/ml sur le site de blessure, sa densité cellulaire est restée constante durant la période d'incubation, alors que la souche sauvage s'est multipliée de 60 à 100 fois après 24h de son dépôt sur pamplemousse. Il a été constaté que la croissance et la multiplication rapide des cellules de *P. guillermondii* souche US-7 étaient nécessaires au développement de l'activité antagoniste de la levure vis-à-vis de *P. digitatum* sur pamplemousses et vis-à-vis de *B. cinerea* sur pommes (Droby et al., 1991).

VI.2- Etude de l'effet de la consommation des éléments nutritifs par l'antagoniste

L'adaptation du microorganisme aux conditions nutritionnelles du milieu et l'aptitude à consommer plus rapidement les éléments nutritifs que le pathogène sont des conditions importantes pour qu'il puisse intervenir dans le contrôle biologique par le mécanisme de la compétition pour la nutrition.

Les sucres, et tout particulièrement le fructose, le glucose et le saccharose, sont les principaux carbohydrates (par ordre décroissant) existants dans les fruits (Filonow, 1998 ; Fuleki et al., 1994 ; Guetsky et al., 2002), et ils sont libérés dans les blessures infligées artificiellement (El Ghaouth et al., 1995). Ces carbohydrates semblent être indispensables pour initialiser la germination et pour effectuer le processus d'infection (formation d'appressorium, pénétration de tissus de fruits) de certains pathogènes comme *B. cinerea*. Ainsi, les antagonistes qui sont capables d'utiliser rapidement ces sucres peuvent être des compétiteurs efficaces.

Afin d'évaluer l'importance de la consommation des sucres par les antagonistes, on utilise une approche qui consiste à mesurer par l'HPLC (High Performance Liquide Chromatographie), le taux de sucre consommé dans le milieu à travers le temps, parallèlement à la cinétique de croissance des souches microbiennes. Ainsi, il a été constaté que les souches antagonistes d'*Enterobacteriaceae* se multiplient et consomment plus rapidement le sucre existant dans le jus de fraise que les souches non antagonistes. L'effet le plus important a été observé pour la souche 5B4 qui constituait l'antagoniste le plus efficace vis-à-vis de *B. cinerea* dans des tests *in vitro* et sur le fruit de fraisier. Ceci a permis de suggérer que les propriétés nutritionnelles de cette souche constituent une part importante dans le mécanisme d'inhibition des blessures des fruits (Guinebretiere et al., 2000). Cependant, cette approche ne paraît pas prendre en considération l'effet de la présence du pathogène sur la compétitivité.

Une autre approche consiste à comparer le taux de consommation de sucre par l'antagoniste et le pathogène quand ils sont en interaction *in vitro* et *in vivo*, par des mesures d'absorption de composés carbonés marqués radioactive. Ainsi, des levures (*Sporobolomyces roseus* et *Cryptococcus laurentii*), antagonistes vis-à-vis de *B. cinerea*, absorbent plus rapidement les sucres marqués au carbone 14 (glucose, fructose, saccharose) que les conidies de *B. cinerea* (Filonow, 1998). Cependant, cette caractéristique ne paraît pas expliquer complètement leur efficacité comme agent de lutte biologique, puisque la souche non antagoniste *Saccharomyces cereviseae* est capable de consommer aussi rapidement le sucre (surtout le glucose et le saccharose) que les souches antagonistes (Filonow, 1998). Sur les blessures de fruits, la compétition pour la nutrition peut probablement s'étendre à d'autres éléments nutritifs que les sucres, comme les composés azotés qui sont présents en faible concentration. A ce jour, très peu d'études ont été réalisées par rapport à ces composés. Cette approche paraît être intéressante pour la compréhension de l'importance du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste des agents de lutte biologique.

VI.3- Effet de la concentration des éléments nutritifs du milieu sur l'interaction de l'antagoniste et du pathogène

Le contrôle biologique qui est basé sur la compétition pour les éléments nutritifs est fortement affecté par le taux des nutriments existants dans le milieu. Il ne peut avoir lieu que dans des conditions nutritionnelles restreintes. Et par conséquent, il peut être annulé par l'augmentation de la concentration de certains éléments nutritifs indispensables pour l'antagoniste et le pathogène (Droby et al., 1989).

Une approche *in vitro* consiste à étudier l'effet de l'antagoniste sur la germination des spores et/ou sur la croissance mycéienne du pathogène quand ils sont placés dans un milieu limité en éléments nutritifs. Droby et al. (1989) ont remarqué une inhibition significative de la germination des spores et de la croissance mycéienne du pathogène *P. digitatum* lorsqu'il a été mis en co-culture avec la levure *Pichia guillermondii* sur des plaques de cultures à trous, dans un milieu synthétique minimal. Cet effet a disparu dans un milieu riche en éléments nutritifs. Ainsi, l'inhibition a pu être partiellement ou totalement annulée par l'addition des nutriments exogènes dans le milieu.

Sur les sites de blessures des fruits, la compétition pour les éléments nutritifs a été étudiée en analysant l'effet de l'addition d'éléments exogènes spécifiques, sur l'activité antagoniste d'agents de biocontrôle (Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Lima et al., 1997 ; Vero et al., 2002, Saligkarias et al., 2002 ; Saravanakumar et al, 2008). Il a été remarqué que la souche MACH1 de *Metschnikowia pulcherrima* a perdu son efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* et *A. alternata*, quand les blessures des pommes ont été additionnées avec une forte concentration de FeCl₃ comparativement à une faible concentration de FeCl₃. Ceci a montré un important effet de compétition pour le fer entre ces microorganismes (Saravanakumar et al, 2008). Une autre étude a montré qu'une suppression de l'activité de biocontrôle de deux levures *Cryptococcus laurentii* et *Candida ciferrii* vis-à-vis de *P. expansum* a été obtenue avec l'addition de nitrate de potassium dans les sites de blessures des pommes, plutôt qu'avec l'addition de sucres ; indiquant ainsi que l'azote est un composé limitant pour le développement des levures et du pathogène. Ceci a permis de suggérer que la compétition pour l'azote sur les blessures peut être l'un des principaux mécanismes impliqués dans le contrôle de la pourriture bleue par ces deux levures (Vero et al., 2002). L'addition d'une quantité de NYDB (Nutrient Yeast Dextrose Agar) aux blessures juste après l'inoculation du pathogène a également réduit significativement l'activité protectrice de

plusieurs antagonistes (*Rhodotorula glutinis*, *C. laurentii*, *Aureobasidium pullulans*, et *Candida oleophila*) vis-à-vis des maladies de post-récolte. Cette observation suggère l'implication de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de ces levures (Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Lima et al., 1997).

Cependant, ces approches analysent l'effet de la compétition pour la nutrition lorsque l'antagoniste et le pathogène sont en interaction par contact direct, ce qui ne permet pas de distinguer si l'effet antagoniste observé est dû seulement à la compétition pour la nutrition ou également à d'autres mécanismes d'action comme la compétition pour l'espace (Janisiewicz et al., 2000).

Janisiewicz et al. (2000) ont développé une approche originale pour étudier la compétition pour la nutrition séparément de la compétition pour l'espace. Elle consiste à utiliser des plaques de cultures avec des inserts cylindriques attachés à une membrane de diffusion qui permettent de co-cultiver l'antagoniste et le pathogène séparés physiquement, tout en ayant un échange des éléments nutritifs du milieu. Cette méthode a été utilisée pour étudier la compétition entre l'agent antagoniste *A. pullulans* (souche ST1-A24) et *P. expansum* pour les nutriments existants en quantité limitée dans le jus de pomme. L'antagoniste a inhibé la germination des conidies du pathogène durant les premières 24h d'incubation. Cependant, en replaçant ces conidies dans un nouveau jus sans antagoniste, elles ont pu reprendre la germination jusqu'à un taux similaire à celui du témoin (non exposé à l'antagoniste). Ainsi, le système des plaques avec inserts facilite la manipulation de l'environnement (ajout des éléments nutritifs et transfert des inserts dans différents substrats) et permet d'étudier l'effet de différents facteurs sur le pathogène d'une façon non destructive. Ce système pourrait être combiné à d'autres techniques déjà existantes pour améliorer la compréhension de l'interaction antagoniste-pathogène dans le contrôle biologique. Il pourrait également servir, entre autre, à déterminer le seuil et la cinétique de réduction des éléments nutritifs qui sont indispensables pour l'inhibition de la germination des conidies du pathogène par l'antagoniste (Janisiewicz et al., 2000). Cependant, cette technique ne permet pas de distinguer s'il y a un effet des métabolites toxiques (enzymes ou antibiotiques) qui peuvent être sécrétés dans le milieu par l'agent antagoniste et diffusés par la membrane vers les conidies du pathogène.

VII- Amélioration de l'efficacité de la lutte biologique contre les maladies de post-récolte

Malgré les progrès effectués dans le développement de la lutte biologique, la mise en œuvre pratique de cette dernière reste difficile à réaliser. Le plus souvent l'emploi des antagonistes seuls offre une protection insuffisante et inférieure à celle apportée par l'utilisation de produits chimiques (Droby et al., 1998). L'amélioration de l'efficacité de la lutte biologique peut ainsi constituer le principal facteur pour la rendre acceptable (Spadaro et Gullino, 2003).

Dès lors, un objectif primordial dans le développement de la lutte biologique correspond à l'amélioration de son efficacité. Cette amélioration peut s'orienter autour de deux axes. Tout d'abord, l'amélioration de l'aptitude de l'antagoniste à contrôler efficacement les maladies de post-récolte sous différentes conditions et de façon reproductive peut être réalisée par une amélioration de la formulation et/ou une amélioration génétique du microorganisme. D'autre part, l'étude et l'amélioration de sa compatibilité avec d'autres méthodes de lutte constituent une voie permettant d'élargir le spectre de lutte.

VII.1- Amélioration de la formulation

La formulation biologique joue un rôle important dans l'augmentation de l'expression des potentialités de protection de l'agent de lutte biologique. Elle peut intervenir dans l'amélioration de la survie et de l'efficacité du microorganisme et dans la persistance de cette efficacité au sein d'un environnement qui n'est pas toujours adéquat. Ce rôle peut être réalisé par l'application d'adjutants tels que les éléments nutritifs, les sels minéraux, les cires ou tout autre additif pouvant dans certains cas stimuler les mécanismes d'action de l'agent de lutte biologique.

Parmi les sels minéraux, le chlorure de calcium a amélioré significativement l'activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea* et de *P. expansum* de plusieurs souches de levures entre autres *Pichia guillermondi*, *P. anomala*, *Candida sake* et *C. oleophila* (Dutrifoy, 2001 ; Jijakli et Lepoivre, 1995 ; Mc Laughlin et al., 1990 ; Wisniewski et al., 1995). Ce phénomène pourrait être attribué à une amélioration de la fixation de l'antagoniste sur la surface de fruit et

à une augmentation de la résistance des parois cellulaires du fruit vis-à-vis des enzymes pectinolytiques de l'agent pathogène. Il semblerait également que le chlorure de calcium provoque une réduction directe de la germination des spores et l'elongation du tube germinatif de certains pathogènes comme *Penicillium spp.* et *B. cinerea* (Dutrifoy, 2001).

Le bicarbonate de sodium combiné avec le produit biocide Aspire® a également montré une grande aptitude à améliorer significativement son effet de biocontrôle (curatif et protecteur) vis-à-vis de *B. cinerea* et de *P. expansum* sur pomme ainsi que de *Monilia fructicola* et *Rhizopus stolonifer* sur pêche (Droby et al., 2003a). La combinaison de deux souches antagonistes *M. pulcherrima* et *C. laurentii* avec le bicarbonate de sodium a permis d'éliminer complètement le *P. expansum* sur pommes stockées dans des conditions d'atmosphère contrôlée (William et al., 2007).

La recherche d'éléments nutritifs (source de carbone et/ou source d'azote) capables de stimuler l'activité antagoniste, constitue l'un des principaux objectifs de recherche dans ce domaine (Costa et al., 2001 ; De Cal et al., 1993 ; El-Ghaouth et al., 2000 ; El-Ghaouth et al., 2001 ; Janisiewicz et al., 1992; Nunes et al., 2002 ; Droby et al., 2003a). Janisiewicz et al. (1992) ont sélectionné *in vitro* les éléments nutritifs (composés hydrates de carbone et composés azotés) qui avaient la propriété d'être favorables à la multiplication de l'antagoniste *Pseudomonas syringae* tout en étant sans effets sur la germination, la croissance du tube germinatif ou sur la croissance radiale de *P. expansum*. Parmi ces composés, la L-asparagine et la L-proline (composés azotés) ont permis l'augmentation de la population de la bactérie sur pomme et l'amélioration de l'efficacité de son activité de biocontrôle. La combinaison du 2-déoxy-D-glucose, un analogue du glucose, à 0,2% et de *C. saitoana* a apporté un niveau de contrôle vis-à-vis des maladies de post-récolte de pommes supérieur à celui du fongicide Thiabendazol. En outre, sur des variétés d'agrumes, cette combinaison a apporté un niveau de contrôle similaire à celui de l'Imazalil vis-à-vis de *P. digitatum* (El-Ghaouth et al., 2000). L'application de 2-déoxy-D-glucose avec les souches de levures *P. anomala* et *C. sake* a également entraîné une augmentation de protection de 30% comparativement à celle observée lors du traitement par les antagonistes seuls contre le développement de *B. cinerea* et *Penicillium sp.* Une étude sur le mode d'action de 2-déoxy-D-glucose a montré qu'à une concentration de 0,4%, il inhibait totalement la germination des conidies et réduisait de 75% la longueur des hyphes de *B. cinerea*. Par contre, aucun effet (stimulateur ou inhibiteur) de cet analogue de sucre n'a été observé sur la croissance des souches de levures dans les blessures (Choutka, 1993). Par ailleurs, des additifs alimentaires ont également amélioré

significativement l'activité antagoniste de trois espèces *C. laurentii*, *R. glutinis* et *A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* sur pommes et ils ont même permis, dans certains cas, de réduire la concentration de l'antagoniste de 100 fois (Lima et al., 2005).

La compréhension des mécanismes d'action ouvre l'opportunité d'améliorer l'activité protectrice de la souche antagoniste en ajoutant à la formulation des molécules capables de stimuler ces mécanismes. Ainsi, l'ajout de parois de pathogène *B. cinerea* à la souche K de *P. anomala* entraîne une augmentation *in situ* de l'activité exo- β -1,3-glucanase (produite par cette souche) et l'amélioration simultanée de son activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea* (Jijakli et Lepoivre, 1998). Cette observation a été complétée par la recherche de molécules analogues à ces parois et possédant des caractéristiques compatibles avec une formulation. Plusieurs molécules de β -1,3-glucanes (HCT, YGT ou HGT) ont été testées en combinaison avec la souche K. Les auteurs ont pu constater que l'addition de YGT (contenant 71% de glucanes) à la souche antagoniste (à une concentration de 10^5 UFC /ml) entraîne un niveau de protection similaire à celui observé lorsque la souche K est appliquée seule à une concentration de 10^7 UFC/ml (Dickburt et al., 2001). Cette réduction de la dose d'application permettrait de réduire le coût du traitement.

Des études ont montré que l'activité antagoniste de *Cryptococcus laurentii* vis-à-vis de *P. expansum* sur poire a été significativement améliorée avec l'amendement du milieu avec la chitine ou l'acide salicylique (Yu et al., 2007 ; Yu et al., 2008). La chitine a permis d'améliorer l'activité chitinase de l'agent antagoniste en plus de l'augmentation de la population de l'antagoniste (Yu et al., 2008). Alors que l'acide salicylique a renforcé l'activité de biocontrôle de *C. laurentii* en induisant une résistance naturelle des fruits (Yu et al., 2007).

VII.2- Manipulations physiologiques et génétiques

Des études sur la manipulation physiologique de la souche CPA-1 de *C. sake* ont montré que les conditions de croissance peuvent améliorer l'aptitude écologique de l'antagoniste. Ainsi, la croissance des cellules de l'antagoniste dans un milieu riche en nutriments à base d'extrait de levure avec une basse activité d'eau (a_w), améliore la viabilité des cellules pour une large gamme d'humidité relative (Teixid? et al., 1998b), tout en

préservant l'efficacité de l'antagoniste vis-à-vis de *P. expansum* (Teixid? et al., 1998a). Abadias et al. (2001) ont également montré qu'il est possible de manipuler physiologiquement la croissance de *C. sake* en utilisant un milieu économique à base de mélasse pour produire une grande concentration de cellules tolérantes au stress hydrique. Ceci pourrait contribuer au développement d'une formulation de cet agent biologique avec une bonne viabilité (temps de demi-vie) et permettant une amélioration ou une conservation à plus long terme de son niveau de protection.

Par ailleurs, les techniques de l'ingénierie génétique peuvent intervenir dans l'amélioration de la résistance aux fongicides, la colonisation des fruits dans les conditions de stockage et la synthèse de composés favorisant l'activité antagoniste (antibiotiques ou sidérophores) (Pusey, 1994 ; Janisiewicz et al., 2008). Les gènes qui confèrent un grand pouvoir antagoniste peuvent être utilisés à travers la sélection ou par utilisation de la technologie de l'ADN recombinant. Ainsi, les gènes impliqués dans le mode d'action d'un microorganisme pourraient être clonés et introduits à d'autres antagonistes potentiels (Janisiewicz, 1998 ; Wisniewski et al., 2005 ; Janisiewicz et al., 2008). Par exemple, le gène *chi42* de *T. harzianum* qui code pour une protéine endochitinase, capable de dégrader les parois cellulaires des champignons, a été introduit dans un plant de citronnier. Une inoculation *in vivo* des fruits transgéniques avec *B. cinerea* a montré une importante réduction du développement des lésions comparativement au témoin (Gentile et al., 2007). Il serait également possible d'introduire un promoteur de ce gène pour améliorer son expression. Par ailleurs, un gène recombinant qui code pour une peptide antifongique (*Psd1*) a amélioré l'activité de biocontrôle de l'antagoniste *Pichia pastoris* vis-à-vis de *P. expansum* sur pomme (Janisiewicz et al., 2008).

VII.3- Combinaison de plusieurs antagonistes

Il serait possible d'améliorer l'efficacité du contrôle biologique en utilisant un mélange de plusieurs antagonistes complémentaires et non compétitifs. Un tel mélange pourrait avoir plusieurs avantages surtout lorsque les antagonistes combinés agissent par des mécanismes différents (Janisiewicz et Bors, 1995; Guestky et al., 2002 ; Calvo et al., 2003 ; Conway et al., 2005 ; William et al., 2007). Parmi ces avantages, il peut avoir un large spectre

d'activité comprenant plusieurs fruits à différents stades de maturation et plusieurs agents pathogènes ciblés. Ceci permet ainsi, une diminution du taux d'application et par conséquent du coût du traitement (Janisiewicz, 1998). De plus, la combinaison de différentes souches présentant des caractères génétiques différents contribue à minimiser le risque d'apparition de souches résistantes chez le pathogène. Le mélange de deux souches antagonistes de *R. glutinis* (souches SL1-C ou SL30-C) avec *C. laurentii* (SL 43) a montré un important effet synergique vis-à-vis de *P. expansum* mais pas vis-à-vis de *B. cinerea* sur pommes. Alors qu'une autre combinaison de *R. glutinis* (SL 1-C) et *C. laurentii* (SL 62) a eu un effet synergique sur *B. cinerea*. Cependant, aucune combinaison n'a permis une amélioration de biocontrôle vis-à-vis des deux pathogènes en même temps (Calvo et al., 2003).

VII.4- Intégration de la lutte biologique à d'autres méthodes de lutte

La combinaison de l'application d'antagoniste avec d'autres traitements chimiques ou physiques afin d'exploiter l'effet additif ou synergique pourrait constituer une voie potentielle d'amélioration de la protection apportée par un schéma phytosanitaire englobant l'utilisation d'antagonistes et elle permet d'atteindre un niveau de protection commercialement acceptable. Ainsi, la compatibilité de la lutte biologique avec d'autres méthodes de lutte doit être vérifiée.

La tolérance de l'antagoniste aux fongicides de synthèse permet de les combiner avec une faible dose du fongicide. Des essais en chambre de conservation ont montré que l'association d'une faible dose de fongicide thiabendazole (TBZ à 100 ppm) aux produits biologiques Biosave® 110 (à base de *P. syringae*) a permis d'obtenir un contrôle similaire à celui obtenu avec le TBZ à la dose normale (569 ppm) (Sugar et Spotts, 1999). Le traitement des poires avec le TBZ juste après la récolte, ensuite avec Bio-save® 110 après 6 semaines de la récolte a permis de contrôler efficacement la pourriture bleue causée par *P. expansum* (Sugar et Basil, 2008). Par ailleurs, la combinaison de l'antagoniste *C. laurentii* et d'une faible dose de TBZ a permis d'assurer un contrôle efficace et prolongé contre des souches de *B. cinerea* résistantes au TBZ (Lima et al., 2006).

A part les traitements chimiques, d'autres méthodes alternatives peuvent être combinées à la lutte biologique, tel que le traitement par la thermothérapie (Jijakli et al,

1998 ; Janisiewicz et al., 2003 ; Conway et al., 2004 ; 2005 ; Zhang et al., 2007b), l'utilisation des produits naturels (El Guilli, 2000), des rayons ultraviolets (Chalutz et al., 1992) ou de l'éthanol (Spadaro et al., 2002). Dans un essai, le traitement des fruits de pommes avec une des deux souches de levures *P. anomala* (souche K) et *C. oleophila* (souche O) en suspension dans un film anti-transpirant combiné avec un traitement thermique par trempage dans l'eau (45°C pendant 10 minutes) a permis d'élargir le spectre des pathogènes contrôlés en agissant non seulement sur *B. cinerea* et *P. expansum* mais également sur les infections latentes dues aux *Gloeosporium* spp. qui sont traditionnellement visées par les traitements chimiques (Jijakli et al, 1999). Le traitement des pommes avec une souche antagoniste résistante à la chaleur et le traitement à la chaleur à une température de 38°C pendant 4 jours ont été complémentaires et ont permis un meilleure contrôle des maladies de post-récolte (Leverentz et al., 2003).

VIII. La lutte biologique avec *Aureobasidium pullulans*

VIII.1- Présentation de l'espèce

Aureobasidium pullulans (de Bary), Arnaud est une pseudo-levure de la famille des Dothioraceae. C'est un saprophyte cosmopolite qui est communément isolé à partir des débris des plantes, du sol, des fruits et des céréales. Les examens cliniques ont rarement rapporté qu'il est un agent pathogène des plantes ou des êtres vivants (Kwon-Chung et Bennet, 1992). Ainsi, il est conforme aux exigences du dossier d'homologation au niveau de son impact toxicologique sur la santé et l'environnement, ce qui constitue un point positif facilitant son enregistrement commercial.

L'espèce *A. pullulans* est connue dans le domaine de l'industrie par la sécrétion de pullulane qui est un polysaccharide biodégradable, utilisé dans l'emballage des médicaments et l'alimentation. L'espèce peut être cultivée dans la plupart des milieux de culture de champignons. Elle est caractérisée par des colonies mycoides blanchâtres qui noircissent avec le vieillissement, des conidies de types blastospores, unicellulaires, hyalines, ovoïdes et de différentes formes et tailles et des hyphes hyalins à parois épaisses et contenant des septas transversaux. Cependant, selon le pH du milieu, la morphologie des cellules produites peut changer. A un pH 4.0, *A. pullulans* peut produire en même temps la forme unicellulaire et la

forme hyphale. Alors qu'à un pH 5.0, elle ne produit que la forme unicellulaire (Mounir et al., 2007). La pseudo-levure peut croître entre 10 et 35°C (ne croît pas à 37°C) avec un optimum à 25°C (Larone, 1995 ; St-Germain et Summerbell, 1996).

VIII.2- *Aureobasidium pullulans* en tant qu'agent de biocontrôle

A. pullulans possède la potentialité d'être un agent biologique efficace vu son aptitude à coloniser une large gamme d'hôtes et à survivre sous différentes conditions environnementales (Kohl et Fokhema, 1994). L'efficacité de cette espèce dans le contrôle des maladies de pré- et de post-récolte de plusieurs cultures a été largement rapportée (Adikaram et al., 2002 ; Castoria et al., 2001 ; Ippolito et al. 2000, 2005 ; Leibinger et al., 1997 ; Lima et al., 1997, 1999, 2003 ; Schena et al., 2003). Une souche d'*A. pullulans* (L47) a été isolée à partir de la surface des raisins de table et a montré une grande efficacité dans le contrôle des pathogènes responsables des pourritures en post-récolte des raisins, des kiwis, des fraises et des pommes (Ippolito et al., 2000, 2005 ; Lima et al., 1997). Ce même isolat, en combinaison avec les sels de chlorure de calcium et de bicarbonate de sodium, était également capable de réduire l'incidence de *B. cinerea* sur les cerises en pré- et en post-récolte (Ippolito et al., 2005). Deux autres isolats (533 et 547) d'*A. pullulans* ont significativement contrôlé les pourritures de post-récolte (*B. cinerea* et *Monilinia laxa*) sur raisins et cerises quand ils sont appliqués en pré- ou en post-récolte (Schena et al., 2003). De même, l'isolat LS30 a montré une importante activité antagoniste vis-à-vis d'un grand nombre de pathogènes de post-récolte comme *B. cinerea*, *P. expansum* sur pommes et *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* sur raisins de table (Castoria et al., 2001 ; Lima et al., 1999). Cet isolat a aussi présenté une grande efficacité dans le contrôle des maladies de post-récolte et la prolongation de la durée de conservation des pommes, quand il est utilisé au champ en combinaison avec une dose réduite de benomyl (Lima et al., 1997b). Un produit biopesticide « Boni-protect » qui contient 2 souches d'*A. pullulans* à une concentration de 5. 10^9 UFC/g a été testé en pré- et en post-récolte pendant 4 années consécutives dans le contrôle des maladies de post-récolte des pommes (*B. cinerea*, *P. expansum* et *Gloeosporium* spp.) et a montré un niveau de protection similaire aux produits chimiques (Weiss et al., 2006). Récemment, une nouvelle souche potentielle nommée Ach1-1 a été isolée à partir de la surface des pommes et a été sélectionnée pour son niveau d'efficacité élevé vis-à-vis de *P.*

expansum et *B. cinerea* sur pommes (Achbani et al., 2005 ; Mounir et al., 2007 ; Krimi Bencheqroun et al., 2007). Un niveau de protection de 89% vis-à-vis de *P. expansum* a été obtenu avec une formulation sèche de la souche Ach1-1 à une concentration de 10^8 UFC/ml après 28 et 7 jours d'incubation sur des pommes stockées à 5 et 25°C respectivement (Mounir et al., 2007).

VIII.3- Mécanismes d'action de certaines souches potentielles d'*A. pullulans*

Plusieurs mécanismes ont été rapportés comme impliqués dans l'activité antagoniste d'*A. pullulans*. Parmi ces mécanismes, il y a la compétition pour la nutrition et l'espace, le mycoparasitisme et l'induction de la résistance de l'hôte (Castoria et al., 1997, 2001; Droby et Chalutz, 1994 ; Ippolito et al., 2000 ; Janisiewicz et al., 2000 ; Lima et al., 1997 ; Wilson et Wisniewski, 1989 ; Wilson et Chalutz, 1989 ; Krimi Bencheqroun et al., 2007). Des essais ont montré que *A. pullulans* (souche LS-30) peut agir vis-à-vis de *B. cinerea* et *P. expansum* sur pomme par la sécrétion d'enzymes extracellulaires exochitinase ($[N\text{-acetyl-}\beta\text{-D-glucosaminidase}$ (Nagase) et $\beta\text{-1,3-glucanase}$) et par la compétition pour la nutrition mais pas par l'antibiose et l'induction de résistance (Castoria et al., 2001). La production d'antibiotiques par des isolats d'*A. pullulans* a été rapportée, ailleurs, mais leur rôle dans l'activité antagoniste n'a pas été clair (McCormack et al., 1993). D'autres essais ont démontré que la souche L47 d'*A. pullulans* est capable d'induire une défense biochimique des tissus de pomme vis-à-vis des pathogènes de post-récolte par l'augmentation de l'activité chitinase, $\beta\text{-1,3-glucanase}$ et peroxydase (Ippolito et al., 2000). Par ailleurs, Lima et al, 1997 ont montré que le principal mode d'action d'*A. pullulans* (souche L47) vis-à-vis de *B. cinerea* sur fraise est la compétition pour la nutrition. Janisiewicz et al., 2000 ont également montré que *A. pullulans* (souche ST1-A24) agit sur l'inhibition de la germination des conidies de *P. expansum* par le mécanisme de la compétition pour la nutrition.

CHAPITRE II :

OBJECTIFS

CHAPITRE II : OBJECTIFS

Nos recherches ont porté sur l’analyse et la compréhension des mécanismes d’action impliqués dans l’activité antagoniste d’une nouvelle souche potentielle *d’Aureobasidium pullulans* Ach1-1 vis-à-vis du pathogène de la pourriture bleue *Penicillium expansum* des pommes en post-récolte. Ces recherches s’inscrivent dans le cadre d’un projet de coopération entre le Maroc et la Belgique visant le développement des méthodes de lutte biologique contre les maladies de post-récolte des pommes et des agrumes, par l’utilisation d’une approche multidisciplinaire.

La première étape de notre travail a pour objectif de distinguer parmi les principaux mécanismes d’action ceux qui jouent un rôle important dans l’activité antagoniste d’*A. pullulans* souche Ach1-1 en la comparant à d’autres souches de la même espèce (souches 1112-3 et 1113-5) et à une souche antagoniste de référence (*Pichia anomala* souche K) vis-à-vis d’une souche marocaine de *P. expansum* 880. Cette étape consiste à réaliser plusieurs essais préliminaires *in vivo* et *in vitro* sur l’importance de l’implication de chacun des mécanismes suivants : (1) la production des composés antifongiques par les antagonistes, (2) l’induction de la résistance dans les tissus de pommes et (3) la compétition pour les éléments nutritifs de la pomme.

La seconde étape est une étude plus approfondie du mécanisme de la compétition pour la nutrition. Elle a pour objectif de (1) vérifier l’hypothèse de l’importance de l’implication de ce mécanisme dans l’activité antagoniste de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* en conditions *in vivo* et (2) identifier parmi les principaux éléments nutritifs de la pomme ceux qui peuvent être les plus limitants dans cette compétition.

CHAPITRE III :
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

I - Matériel biologique et milieux de cultures

I.1- La souche pathogène

Le pathogène *Penicillium expansum* Link souche 880 a été isolé, par l'INRA de Meknès (Maroc), à partir de pommes infectées par la pourriture bleue. Cette souche a été classée parmi les plus virulente de la collection (données non publiées). Elle a été conservée à long terme à –80°C, dans une solution de glycérol (20%) et à court terme (6 mois) sur le milieu *Potato Dextrose Agar* (PDA) à 4°C et à l'obscurité. Avant son utilisation à partir de la forme conservée à court terme, la souche de *P. expansum* a été mise en culture sur PDA à 25°C sous une photopériode de 12 ou 16 heures. La suspension des conidies a été préparée, à partir d'une culture âgée de 10 à 15 jours, dans une suspension aqueuse stérile contenant du Tween 20 (0,05%). La concentration des conidies a été ajustée à l'aide d'un hématimètre (cellule de Bürker).

I.2- La souche antagoniste

La souche Ach1-1 d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud a été isolée en Belgique à partir de la surface de pommes saines de Golden Delicious et sélectionnée pour son efficacité vis-à-vis de *P. expansum* et de *B. cinerea* sur pomme (Achbani et al., 2005). Son identification a été réalisée par la société DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) en Allemagne. Cette souche antagoniste a été conservée à long terme sous forme de suspension dans une solution de glycérol (20%) à –80°C et à court terme (6 mois) sur le milieu PDA à 4°C. Avant son utilisation, elle a été repiquée, à partir de ce stock, trois fois successivement avec un intervalle de 24 heures sur le milieu PDA à 25°C. À la quatrième génération, elle a été prélevée à l'aide d'une tige en verre coudée puis mise en suspension dans de l'eau isotonique stérile (NaCl, 0,85%). La concentration a été ajustée à l'aide d'une cellule de Bürker.

1.3- Autres souches microbiennes

Des souches antagonistes d' *A. pullulans* (1112-3 et 1113-5) et de *Pichia anomala* (souche K) ont été utilisées dans certains essais comme modèle de comparaison avec la souche Ach1-1. Les souches 1112-3 et 1113-5 d' *A. pullulans* (De Bary) Arnaud. v. *pullulans* ont été isolées au Maroc à partir de la surface des pommes et identifiées par BCCM/ MUCL à Louvain-la-Neuve en Belgique. Ces souches ont présenté un effet de protection vis-à-vis de *B. cinerea* et *P. expansum* sur pommes en post-récolte (Achbani et al., 2005). La souche K de *Pichia anomala* (Hansen) H. P. Sydow a été sélectionnée à l'unité de phytopathologie de la FUSAGx pour son efficacité vis-à-vis de *P. expansum* et *B. cinerea* sur pommes (Jijakli, 1996). Ces souches antagonistes ont été conservées et utilisées de la même manière que la souche Ach1-1 d'*A. pullulans*.

I.4- Le matériel végétal

Les fruits de pommes utilisés appartiennent à la variété Golden Delicious et ont été achetés au marché local et conservés pendant 1 à 2 semaines à 1°C à atmosphère normale jusqu'à leur utilisation. Ces fruits ont été produits par le groupe Limdor Bourdelas (St-Yrieix-La Perche, France) et avaient été stockés dans une chambre froide juste après la récolte sans aucun traitement chimique de post-récolte.

I.5- Milieux de cultures utilisés

Le repiquage des souches antagonistes et pathogène a été effectué sur un milieu PDA (*Merck* et *Oxoid*). Un milieu liquide aqueux contenant différentes dilutions de jus de pomme (*Materne*, 100% jus pure, sans édulcorant ni conservateurs) a également été utilisé dans les tests *in vitro*. Ce milieu a été autoclavé durant 20 minutes à 110°C, juste avant son emploi.

II - Niveau d'efficacité d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* sur pomme

L'efficacité des souches antagonistes Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* a été évaluée sur les blessures de pomme comme décrit précédemment par Jijakli et Lepoivre (1993), avec quelques modifications. Les fruits ont été désinfectés et blessés à l'aide d'un emporte pièce de 8 mm de diamètre et de 4 mm de profondeur (deux blessures par pomme). Des suspensions de 50 µl des antagonistes (ou l'eau isotonique pour les témoins) ont été appliquées dans les blessures à des concentrations de 10^5 , 10^6 et 10^7 UFC/ml. Après 24 heures d'incubation à 25°C, une suspension de 50 µl de spores de *P. expansum* 880 (10^6 spores/ml) a été inoculée dans les blessures. Les pommes ont été incubées, dans des boites en plastique fermées contenant un papier filtre humidifié, à 25°C dans l'obscurité pendant cinq jours. Les diamètres des lésions ont été mesurés et le taux d'efficacité a été calculé selon la formule : $(Dt\acute{e}-Dtr)/Dt\acute{e} \times 100$, avec Dt_e et Dtr représentant respectivement les diamètres des lésions des pommes témoins et des pommes traitées moins le diamètre initiale de la blessure. Cinq pommes (10 sites blessés) ont été inoculées par souche. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

III - Evaluation de l'implication des métabolites toxiques et de l'induction de résistance chez les pommes dans l'activité antagoniste des souches d'*A. pullulans* in situ

III.1- Production des composés antifongiques

Pour évaluer l'implication des métabolites toxiques dans l'activité antagoniste des souches Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans*, l'effet de l'application de filtrats des antagonistes cultivés sur blessures de pommes a été évalué *in vivo* vis-à-vis de *P. expansum*.

Lors d'une première étape, les cellules des antagonistes Ach1-1 et 1112-3 seules ou en présence du pathogène ont été cultivées sur des blessures de pommes de 20 mm de diamètre. Une suspension de 200 µl des antagonistes, à une concentration de 10^8 UFC/ml, a été appliquée sur ces blessures de pommes. Après 24 heures d'incubation à 25°C, à l'obscurité, une partie des pommes a été inoculée avec 200 µl d'une suspension de *P. expansum* à une concentration de 10^6 conidies/ml additionnée de Tween 20 (1 blessure x 7 pommes/

traitement), et l'autre partie a été traitée avec le tween 20 seulement (1 blessure x 7 pommes/ traitement). Après une incubation supplémentaire de 24 heures sous les mêmes conditions, la couche supérieure de chaque blessure a été détachée par un léger frottement avec un fil de platine tout en ajoutant 500 µl d'eau distillée. Le contenu de la blessure a été récupéré par pipetage. Les suspensions de chaque type de traitement ont été rassemblées dans un tube Falcon et centrifugées pendant 10 min. Le surnageant a été récupéré puis filtré à l'aide d'un filtre à seringue (Acrodisc) de 20 µm de porosité.

Dans une seconde étape, des nouvelles pommes blessées ont été réparties selon quatre modalités (5 pommes /objet) : (1) pommes non traitées [témoins], (2) pommes traitées avec le filtrat de culture des antagonistes seuls [FC (antg)], (3) pommes traitées avec le filtrat de culture des antagonistes en présence du pathogène [FC (antg+path)], (4) pommes traitées avec une suspension de cellules des antagonistes fraîchement collectées des boites de Pétri et ajustée à une concentration de 10^7 UFC/ml [cellules]. Pour chaque blessure (2 blessures de 8 mm de diamètre par pomme), 50 µl de solution ou suspension y a été ajoutée. Après 3 heures de séchage sous flux, les pommes ont été inoculées avec 50 µl d'une suspension de *P. expansum* à une concentration de 10^4 conidies/ml. Le diamètre des lésions a été mesuré sur les fruits après une incubation de cinq jours à 25°C à l'obscurité. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

III.2- Induction de la résistance des fruits traités par les souches antagonistes

Afin d'évaluer l'apparition de la résistance induite chez les pommes traitées avec les souches Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans*, l'effet de leur application à distance du pathogène sur le niveau de protection a été testé.

Les pommes désinfectées ont été blessées à l'aide d'un emporte pièce de 8 mm de diamètre (8 blessures périphériques et une blessure centrale) selon deux dispositions des blessures rapprochées et des blessures éloignées (figure 2). La suspension des souches antagonistes a été appliquée, à une concentration de 10^7 UFC/ml, sur les blessures périphériques (50 µl/ blessure). Après 24 heures d'incubation, une suspension des spores de *P. expansum* (10^6 conidies/ml) a été appliquée dans la blessure centrale (50 µl/ blessure). Le diamètre des lésions a été mesuré sur les fruits après sept jours d'incubation à 25°C à

l'obscurité. Cinq fruits ont été utilisés par type de traitement. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

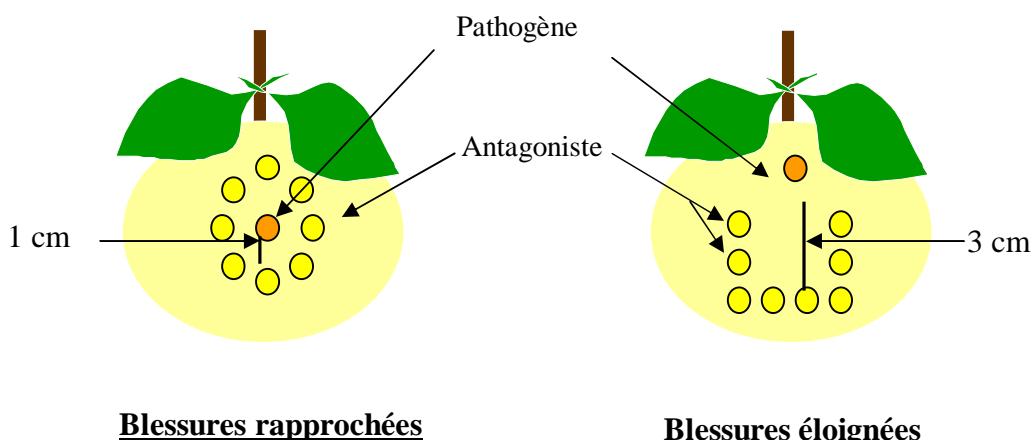


Figure 2 : Représentation des dispositions des blessures réalisées sur pommes

IV- Etude *in vitro* de l'implication de la compétition pour la nutrition de souches d'*A. pullulans* dans l'inhibition de la germination des conidies de *P. expansum*

IV.1- Cinétique de croissance des souches d' *A. pullulans* dans des milieux restreints en éléments nutritifs

Afin d'évaluer l'adaptation des antagonistes d'*A. pullulans* (souches Ach1-1, 1112-3 et 1113-5) à des concentrations différentes en nutriments, leur cinétique de croissance a été étudiée dans des milieux présentant différentes concentrations de jus de pomme.

Dans les trous des plaques de culture cellulaires à 24 trous (TC-tests plats), 300 µl d'une suspension d'eau isotonique contenant un des antagonistes à 10^7 ufc/ml a été ajoutée à 300 µl de jus de pomme. Les concentrations finales en jus de pomme correspondaient à 0,1 ; 0,5 ; 1 ; et 5%. Les plaques ont été placées à l'obscurité sous agitation (80 rpm) dans une chambre de culture conditionnée à 25°C. Après des temps d'incubation de 0, 6, 24, 48 et 72 heures, la densité cellulaire des antagonistes a été mesurée à l'aide d'un hématimètre (la cellule de Neubauer). Deux répétitions ont été utilisées par concentration de jus et par temps de prélèvement. L'essai a été réalisé une fois dans le temps.

IV.2- Etude de la compétition pour la nutrition *in vitro*

La compétition pour la nutrition a été étudiée *in vitro* par l'utilisation d'une méthode non destructive développée par Janisiewicz et al. (2000). Le dispositif est constitué de plaques de cultures cellulaires à 24 trous (TC-tests plats) et d'inserts cylindriques (Millicell-CM, Millipore, Belford, MA) dont la partie inférieure est attachée à une membrane à filtre (PTFE) de 0,4 µm de porosité. Ce type de système permet une séparation physique de l'antagoniste et du pathogène avec un échange des éléments nutritifs et des métabolites produits dans le milieu.

A l'aide de cette méthode, l'effet des souches antagonistes d'*A. pullulans* (1113-5, 1112-3 et Ach1-1) et de *P. anomala* (souche K) sur la germination des conidies de *P. expansum* a été étudié, dans des milieux de jus de pomme dilué à des concentrations croissantes. Ainsi, les suspensions contenant les antagonistes à une densité de 10^7 UFC/ml et le jus de pomme à différentes concentrations (0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5%) ont été préparées dans les trous des plaques de culture (600 µl/ trou). Les inserts ont été placés dans le trou et les suspensions des conidies de *P. expansum* (2.10^5 conidies/ml) ont été déposées à l'intérieur de l'insert (400 µl/ insert). Les plaques avec les inserts ont été mises en incubation à 25°C à l'obscurité, sous agitation à 80 rpm pendant 24h. Les témoins étaient constitués par des cultures de *P. expansum* seul avec les mêmes concentrations de jus. Après l'incubation, les inserts ont été enlevés des trous et égouttés sur un papier absorbant. Pour chaque insert, la membrane a été coupée avec un scalpel et transférée sur une lame de microscope avec une goutte du colorant bleu de coton de lactophénole pour les observations microscopiques. L'effet des souches antagonistes sur le *P. expansum* dans les différents milieux a été évalué en comparant le pourcentage de germination des conidies de chaque cas avec le témoin correspondant. Les conidies germées ont été quantifiées parmi un échantillon de 100 conidies en utilisant deux membranes par traitement. L'elongation du tube germinatif des conidies a été évalué selon une échelle de germination : 1= pas de germination, 2= tube germinatif <4x taille de la conidie, 3=tube germinatif >4x taille de la conidie (Annexe 1). L'expérience a été réalisée une fois dans le temps.

Lorsqu'un effet inhibiteur de la germination a été observé, des essais supplémentaires ont été réalisés pour évaluer la viabilité des conidies et la possibilité de la réversibilité de cette inhibition (Figure 3). Ainsi, les conidies inhibées dans les suspensions contenant les souches

antagonistes Ach1-1, 1113-5 et la souche K avec le jus à une concentration de 0,5% ont été soumises à des nouvelles conditions nutritives en absence ou en présence des antagonistes. Ces nouvelles conditions ont été obtenues de deux manières. D'un côté, une quantité de jus de pommes a été ajoutée aux mêmes milieux du premier essai contenant déjà les antagonistes, afin d'obtenir des concentrations de 0,5 et 5%. D'un autre côté, les inserts contenant les conidies inhibées ont été transférés à des nouveaux milieux de jus de pommes à des concentrations de 0 ; 0,5 ou 5% (en absence des antagonistes). Après 24 h supplémentaires d'incubation, le pourcentage de germination des conidies a été évalué en utilisant deux membranes par traitement et un total de 100 conidies par membrane. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

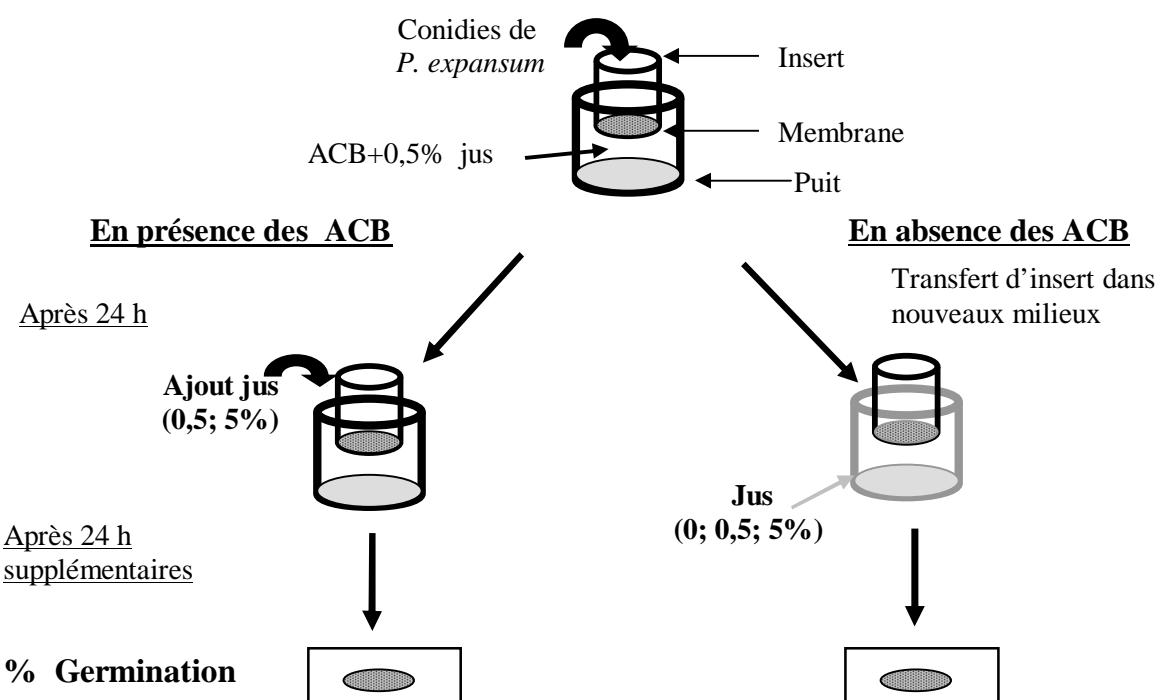


Figure 3 : Schéma des manipulations réalisées pour l'étude *in vitro* de l'implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste des agents de contrôle biologiques (ACB) (souches Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et souche K de *P. anomala*) vis-à-vis de *P. expansum*

IV.3- Evaluation de la présence des métabolites toxiques

Les conidies de *P. expansum* ont été incubées durant 48 heures en présence de la suspension des souches antagonistes (Ach1-1, 1113-5 et souche K) dans du jus à 0,5%. Après enlèvement de l'insert, le milieu de culture contenant les antagonistes a été filtré à travers un filtre de 0,22 µm de porosité (Acrodisc). Le filtrat a été récupéré afin d'évaluer son effet inhibiteur sur la germination de *P. expansum* et de le comparer à celui développé par des cellules vivantes des agents antagonistes.

Dès lors, une suspension des cellules vivantes des souches Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et de la souche K de *P. anomala* ou leurs filtrats de culture ont été introduits chacun dans des puits contenant 0,5% de jus et ont été mis en contact avec de nouvelles conidies de *P. expansum* à 2.10^5 conidies/ ml pendant 24h. Le témoin a été représenté par des conidies du pathogène mises dans un milieu de jus en absence des antagonistes ou de leurs filtrats. Le taux de germination des conidies a été déterminé comme précédemment. Deux membranes ont été observées pour chaque cas et l'expérimentation a été répétée deux fois dans le temps.

V- Evaluation *in situ* de l'implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans*

V.1- Compétition pour les éléments nutritifs des pommes

La compétition pour la nutrition a été étudiée *in situ* en évaluant l'effet de l'application exogène dans les blessures des composés majeurs de la pomme (acides aminés, vitamines et sucres) sur l'activité protectrice de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum*.

Les fruits ont été blessés avec un emporte-pièce (3 blessures de 4 mm de diamètre et 4 mm de profondeur par pomme) et traités avec 40 µl de la suspension de l'antagoniste à une concentration de 10^7 UFC/ml. Après une heure d'incubation, les blessures ont été inoculées avec 40 µl de la suspension des conidies de *P. expansum* à une concentration de 10^5 conidies/ml. Après le séchage des blessures, 40 µl d'eau distillée ou de l'une des solutions nutritives ont été ajoutés. Trois solutions ont été préparées en mélangeant la plupart des acides

aminés, des vitamines et des sucres, connus pour être présents dans les tissus des pommes, avec des concentrations supérieures à celles rapportées pour les pommes (20, 20, 5 fois respectivement) (Tableau 2) (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001). Les témoins ont été traités avec les mêmes solutions en absence de la souche Ach1-1. Les diamètres des lésions ont été mesurés après 5 jours d'incubation à 25°C à l'obscurité. Le niveau d'efficacité a été calculé comme précédemment. Le taux de réduction du niveau d'efficacité par l'addition des éléments nutritifs a été calculé selon la formule : [(Ea-En) / Ea x 100], avec Ea et En représentant respectivement les taux d'efficacité de la souche antagoniste sans et avec l'addition des éléments nutritifs. Quinze pommes (3 sites de blessure/ pomme) ont été utilisées pour chaque traitement. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

Tableau 2 : Liste des éléments nutritifs ajoutés dans les blessures des pommes

Groupes des nutriments	Nutriments spécifiques	Concentration (g/L) ^(a)
Solution 1: Acides aminés		
§ Groupe 1	Serine Acide glutamique Glycine	1,9 0,3 1,9
§ Groupe 2	Thrénanine Arginine Histidine Alanine Acide aspartique Proline	1,7 1,4 0,7 1,7 0,2 1,7
§ Groupe 3	Tryptophane Leucine Lysine Méthionine Phénylalanine Tyrosine Valine	0,5 1,0 2,9 0,5 1,2 0,01 2,1
Solution 2: Vitamines		
	Acide ascorbique Thiamine Riboflavine Niacine Acide pantothenique Pyridoxine Tocopherol	1357,1 4,0 3,3 18,3 145,2 11,4 76,2
Solution 3: Sucres		
	Saccharose Glucose Fructose	88,6 104,0 252,5

^(a)Concentration des acides aminés, des vitamines et des sucres correspondant respectivement à 20, 20 et 5 fois celles rapportées dans le tissus des pommes (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001)

V.2- Importance de la compétition pour les acides aminés des pommes

L'effet de l'application exogène de différentes concentrations des acides aminés sur le niveau d'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* a été évalué en utilisant la même méthode que précédemment (Chapitre III, paragraphe V.1). Les acides aminés connus pour être présents dans les tissus des pommes ont été utilisés à des concentrations 2, 10 ou 20 fois supérieures à celles rapportées dans le tissu des pommes (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001). Quinze pommes (3 sites de blessure/ pomme) ont été utilisées pour chaque traitement. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

L'effet de l'excès des acides aminés dans les blessures sur la croissance de la population de la souche antagoniste Ach1-1 a été évalué. Après 24 heures d'incubation de l'antagoniste, le tissu de pomme contenant la blessure a été récupéré avec un scalpel, placé dans un tube stérile contenant 5 ml du tampon PKT (0,05M de phosphate de potassium à un pH de 6,5 et 0,005% de Tween 80) ensuite broyé manuellement. Cinq pommes avec trois blessures chacune ont été utilisées. Pour chaque pomme, les suspensions des cellules récupérées à partir des trois blessures ont été rassemblées et diluées par un facteur de 10^3 et 10^4 et étalées sur milieu PDA (50 µl/boîte de Petri). Ainsi, cinq boîtes de Pétri ont été préparées par dilution et par traitement. Les boîtes ont ensuite été incubées à 25°C pendant 2 jours et le nombre de colonies de la souche Ach1-1 a été calculé. L'expérience a été répétée 2 fois dans le temps.

VI- Analyse de l'assimilation des acides aminés des pommes par l'antagoniste et/ou le pathogène par chromatographie en phase liquide

Les pommes blessées ont été réparties selon quatre modalités (10 pommes/objet) : (1) pommes non traitées (témoins), (2): pommes traitées avec la souche Ach1-1 seule (antagoniste), (3) pommes traitées avec *P. expansum* seul (pathogène) (4) pommes traitées avec la souche Ach1-1 suivi, après une heure, par l'inoculation de *P. expansum* (antagoniste + pathogène). Les deux microorganismes ont été utilisés en suivant la méthodologie des essais de biocontrôle. Pour chaque objet, 50 µl du tampon PKT ont été ajoutés dans chaque blessure et ensuite récupérés par pipetage après 0, 6, 14 et 24 h de l'application de l'antagoniste. Les échantillons de chaque objet (30 échantillons) ont été mélangés et la concentration de chaque

acide aminé existant a été déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (High- Performance Liquid Chromatography) et détectée par fluorescence. Les échantillons ont été dérivatisés avec 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ.Fluor) et séparés sur une colonne d'acide aminé (Water AccQ.Tag column) thermostatisé à 37°C. Les acides aminés ont été détectés par un détecteur fluorescent (Waters 2475) avec une longueur d'onde d'excitation de 250 nm et une longueur d'onde d'émission de 395 nm. L'identification des acides aminés a été confirmée par comparaison de leur temps de rétention avec celui de standards (Sigma Chemical Co.).

Un essai de biocontrôle a été conduit en parallèle, comme décrit précédemment, pour évaluer l'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* dans les conditions de cet essai.

VII- Compétition pour des acides aminés spécifiques

VII.1- Compétition *in vivo* pour des groupes d'acides aminés

L'effet de l'application exogène, dans les blessures des pommes, de trois groupes d'acides aminés sur le niveau d'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* a été évalué. Le groupement des acides aminés a été fait selon les résultats obtenus par l'analyse chromatographique (voir chapitre IV, paragraphe V). Ces groupes d'acides aminés ont été préparés avec une concentration 20 fois supérieure à celle rapportée dans les tissus des pommes (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001). Quinze pommes (3 sites de blessure/ pomme) ont été utilisées pour chaque traitement. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

VII.2- Compétition *in vivo* pour des acides aminés individuels

Afin de trouver l'élément le plus limitant dans la compétition pour la nutrition, les acides aminés appartenant au groupe 1 (sérine, glycine et acide glutamique) ont été évalués individuellement dans les essais de biocontrôle sur les blessures de pommes, en comparaison avec un élément du groupe 2 qui est lalanine. Ainsi, chacun de ces acides aminés a été appliqué dans les blessures, comme précédemment (Chapitre III, paragraphe V.1) avec une concentration 20 fois supérieure à celle rapportée dans les tissus des pommes (USDA nutrient

database for standard reference, release 14, 2001). Quinze pommes (3 sites de blessures/pomme) ont été utilisées pour chaque traitement. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

VII.3- Effet *in vitro* des acides aminés sur la germination des conidies du pathogène

Le rôle des trois acides aminés (sérine, glycine et acide glutamique) dans l'effet inhibiteur de la souche antagoniste Ach1-1 de la germination des conidies du pathogène *P. expansum* a été évalué dans un milieu synthétique *in vitro*. L'essai a été conduit sur les plaques de culture avec inserts comme précédemment (chapitre III, paragraphe IV.2) en utilisant un milieu minimum de base de Lilly et Barnett (1951) qui ne contient aucune source azotée. Ce milieu est composé de : 10g D-glucose ; 1g KH₂PO₄ ; 0,5g MgSO₄.H₂O ; 0,01 mg FeSO₄.7H₂O ; 8,7 mg ZnSO₄.7H₂O ; 3 mg MnSO₄.H₂O ; 100 µg Biotine ; 100 µg Thiamine ; 1L eau désionisée. Pour tester l'effet des trois acides aminés (sérine, glycine et acide glutamique), le milieu de base a été additionné par chacun des acides aminés à différentes concentrations allant de 0 à 20 fois (0 ; 0,5 ; 1 ou 20 fois) celles rapportées dans les tissus des pommes (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001). Les suspensions contenant l'antagoniste *A. pullulans* souche Ach1-1 (10^7 UFC/ml) et le milieu synthétique avec les acides aminés ont été mis dans les puits des plaques de culture (600 µl/ puit). Les inserts ont été placés dans le puit et les suspensions des conidies de *P. expansum* (2.10^5 conidies/ml) ont été déposées à l'intérieur de l'insert (400 µl/ insert). Les plaques avec les inserts ont été mis en incubation à 25°C à l'obscurité pendant 24h. Les témoins ont été représentés par des cultures de *P. expansum* seul (sans antagoniste) dans les mêmes concentrations d'acides aminés. Après l'incubation, la germination des conidies de *P. expansum* a été quantifiée parmi un échantillon de 100 conidies en utilisant deux membranes par traitement. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

VIII - Analyse statistique

Pour tous les essais, un dispositif en bloc aléatoire complet a été utilisé. Les résultats obtenus ont subi une analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification ($P<0,05$) en utilisant le logiciel SAS/STAT (Statistical Analysis System).

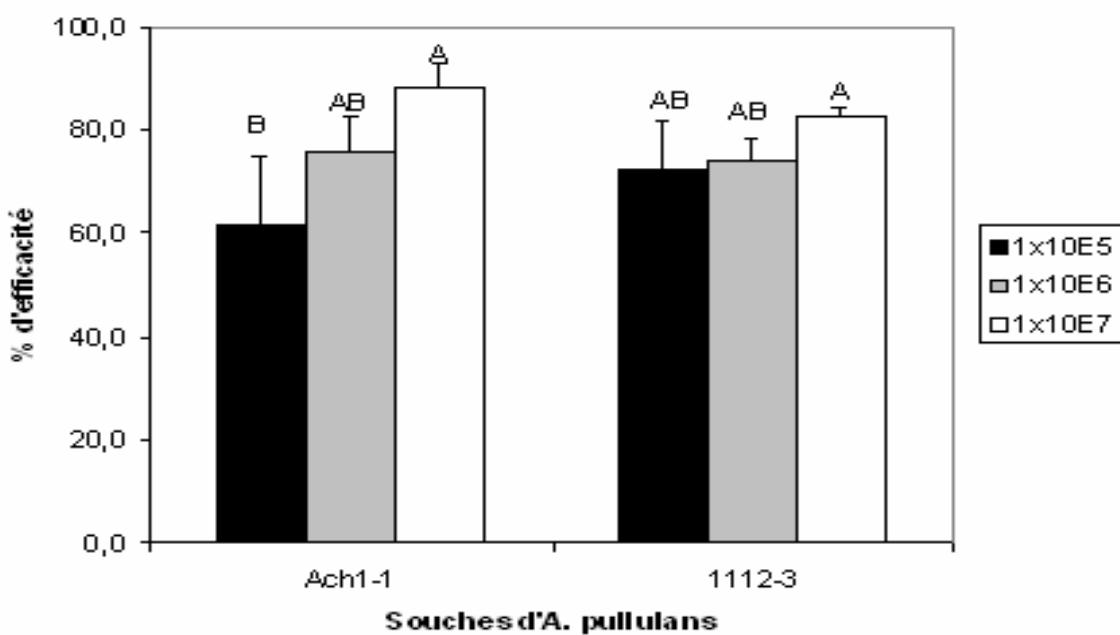
CHAPITRE IV :

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

I - Niveau d'efficacité d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* sur pomme

Les souches antagonistes d'*A. pullulans* (Ach1-1 et 1112-3) ont montré une importante activité antagoniste vis-à-vis de *P. expansum* sur pommes. En effet, l'application des cellules de ces antagonistes dans les blessures des pommes a significativement réduit le diamètre des lésions causées par le pathogène par rapport au témoin non traité et a engendré un niveau d'efficacité élevé (Graphique 2). L'analyse de la variance des taux d'efficacité n'a pas montré de différence significative entre les différents traitements utilisés. Ainsi, quelle que soit la densité des cellules appliquée, les deux souches antagonistes ont eu un niveau d'efficacité presque similaire vis-à-vis de *P. expansum* qui dépasse 75 %.



Graphique 2 : Effet de l'application des souches Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* dans les blessures des pommes à trois densités (10^5 , 10^6 et 10^7 UFC/ml) sur le pourcentage moyen d'efficacité vis-à-vis de *P. expansum* par rapport au témoin non traité. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 10 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$)

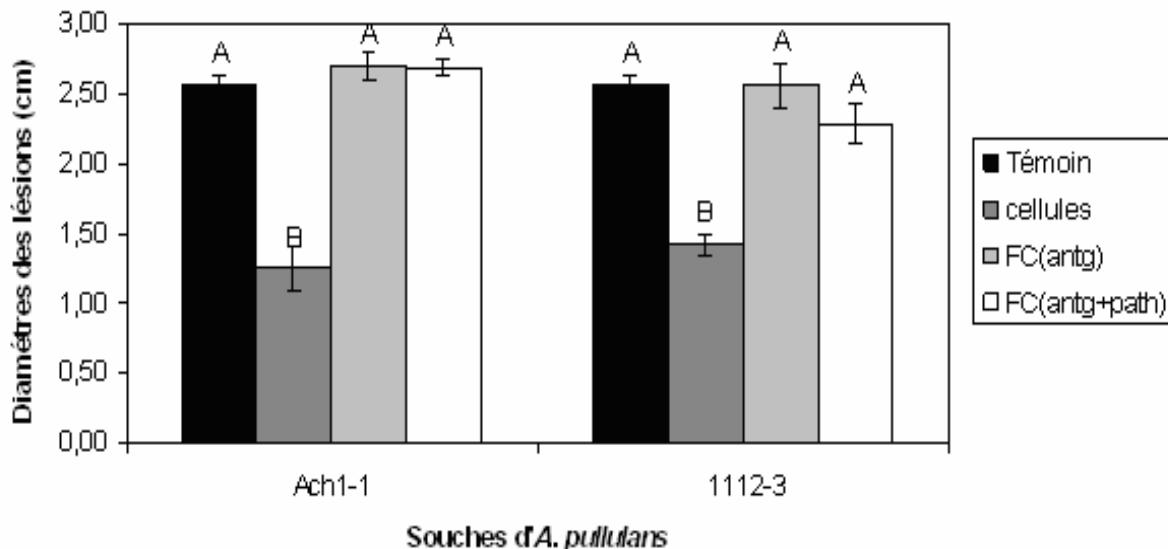
Dans d'autres études, plusieurs souches *d'A. pullulans* ont également montré une grande activité antagoniste non seulement vis-à-vis de *P. expansum* sur pomme mais aussi contre la majorité des pathogènes de post-récolte de différentes cultures (Adikaram et al., 2002 ; Castoria et al., 2001 ; Ippolito et al. 2000, 2005 ; Leibinger et al., 1997 ; Lima et al., 1997, 1999, 2003 ; Schena et al., 2003). Dans le cadre du projet de coopération où s'inscrit notre étude, les souches Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* ont été isolées à partir de la surface des pommes et ont montré une importante activité antagoniste vis-à-vis des principaux pathogènes des pommes en post-récolte *P. expansum* et *B. cinerea* (Achbani et al., 2005). La capacité de ces souches à contrôler le développement de *P. expansum* a été confirmée dans nos essais de biocontrôle sur pommes (Graphique 2). Elles ont montré des niveaux d'efficacité similaires vis-à-vis de *P. expansum*

II - Evaluation de l'implication des métabolites toxiques et de l'induction de résistance chez les pommes dans l'activité antagoniste des souches d'*A. pullulans* *in situ*

II.1- Production des composés antifongiques

L'implication éventuelle des composés antifongiques dans l'activité antagoniste des souches Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* a été étudiée en examinant l'impact de l'application, dans les blessures des pommes, des filtrats de culture des antagonistes (préalablement cultivés seuls ou en présence du pathogène) sur la réduction du développement du pathogène, comparativement au témoin non traité et aux objets traités avec les cellules vivantes des antagonistes.

L'analyse statistique des diamètres des lésions causées par *P. expansum* a montré que seule l'application des cellules des antagonistes a eu un effet significatif sur la réduction du diamètre des lésions comparativement au témoin non traité. Par contre, les deux types des filtrats de culture (souches antagonistes seules ou en présence du pathogène) n'ont pas eu d'effet sur le diamètre des lésions (Graphique 3).



Graphique 3 : Effet de l'application dans les blessures des pommes des filtrats de culture des antagonistes souches Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* seuls [FC(antg)] ou en présence du *P. expansum* [FC(antg+path)] ou des cellules des antagonistes (cellules) sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum*. Le témoin est représenté par des blessures non traitées. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 10 répétitions par objet. L'essai a été produit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$)

Il apparaît que l'activité antagoniste des deux souches d'*A. pullulans* Ach1-1 et 1112-3 n'est pas obtenue par l'application de leurs filtrats de culture, même si ceux-ci proviennent d'une culture préalable des cellules des antagonistes en présence des conidies du pathogène. La présence des cellules vivantes des deux antagonistes est ainsi indispensable pour garantir un contrôle biologique du champignon.

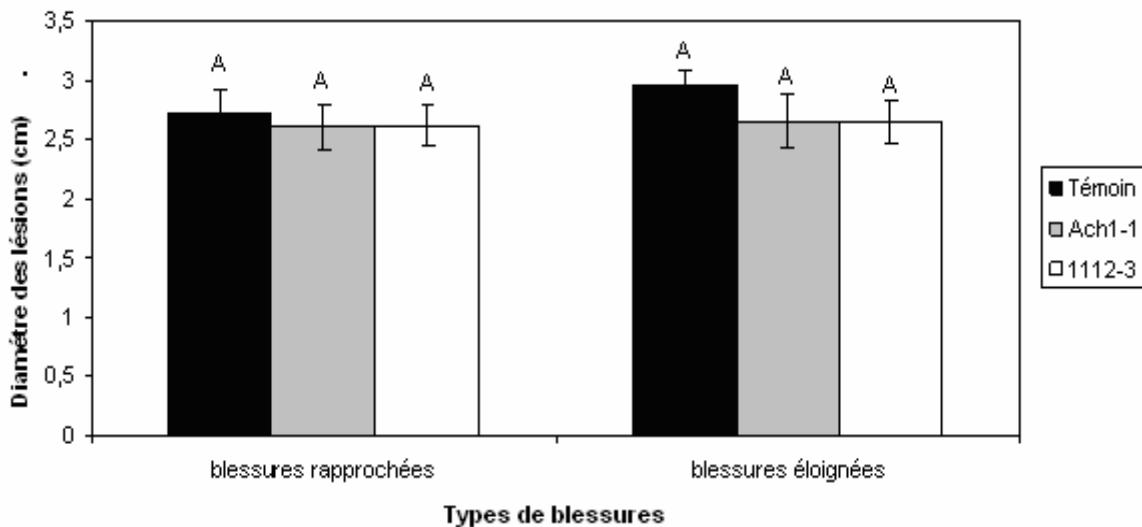
Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas d'une autre souche d'*A. pullulans* (LS-30) en appliquant son filtrat de culture dans les blessures des pommes pour le contrôle de *P. expansum* et de *B. cinerea* (Castoria et al., 2001). Plusieurs études ont cependant rapporté que l'effet des filtrats de culture d'agents antagonistes sur la réduction de l'infection de l'hôte par le pathogène peut être lié à la sécrétion dans le milieu de métabolites toxiques (antibiotiques, enzymes lytiques ou autres) par les antagonistes (Droby et al., 1989 ; Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Guetsky et al., 2002 ; Spadaro et al., 2002 ; Yu et al., 2008). Yu et al. (2008) ont montré que l'application dans les blessures des poires du filtrat de culture de *Cryptococcus laurentii*, qui a été préalablement cultivé dans un milieu NYDB additionné de la chitine (qui est une composante de la paroi cellulaire du champignon)

pendant 24h, a entraîné une activité antagoniste vis-à-vis de *P. expansum* qui a été associé à une importante activité enzymatique chitinase. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent une absence ou une faible implication (non significativement observable à l'échelle des essais *in vivo*) des métabolites toxiques, sécrétés dans le milieu, dans l'activité antagoniste des deux souches d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum*. Pour mettre en évidence la production d'antibiotique par les agents de lutte biologique, plusieurs auteurs ont généralement recours à des essais de culture en duale dans les conditions *in vitro*, qui consiste à l'observation d'une zone d'inhibition de croissance de la colonie du pathogène lorsqu'il est mis en culture avec l'antagoniste sur boîte de pétri (Castoria et al., 1997 ; Janisiewicz et al., 2000; Calvo et al., 2007 ; Saravanakumar et al., 2008 ; Mikani et al., 2008). Cependant, cela ne signifie pas toujours une production au niveau des sites d'action *in situ* ou que l'antibiotique intervienne en totalité ou en partie dans l'antagonisme. D'où l'intérêt de notre méthode qui part directement des conditions *in vivo* et évalue l'effet réel de ces métabolites dans le biocontrôle comparativement aux cellules vivantes des agents antagonistes.

II.2- Induction de la résistance des fruits traités par les souches antagonistes

L'implication du mécanisme de l'induction de la résistance des pommes par les souches antagonistes Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* dans leur activité antagoniste vis-à-vis de *P. expansum* a été évaluée *in vivo* en analysant l'effet de leur application dans des sites de blessures séparés du site d'inoculation du pathogène.

Les analyses statistiques des diamètres des lésions obtenus ont montré que l'application des souches antagonistes Ach1-1 et 1112-3 à distance du pathogène n'a pas eu d'effet significatif sur la réduction du diamètre des lésions causées par *P. expansum* par rapport aux témoins correspondants (Graphique 4). En effet, quelle que soit la distance utilisée entre les blessures périphériques et la blessure centrale (blessures rapprochées ou blessures éloignées), les agents antagonistes n'ont pas engendré de réaction de défense des tissus des pommes vis-à-vis de *P. expansum* significativement observable en terme d'inhibition du développement du pathogène.



Graphique 4 : Effet de l'application des souches antagonistes Ach1-1 et 1112-3 d'*A. pullulans* dans des sites de blessures rapprochés ou éloignés du site d'inoculation du pathogène *P. expansum* sur le diamètre des lésions (cm) causées par le pathogène. Les témoins sont représentés par des blessures non traitées avec les antagonistes et ayant le même dispositif que les objets traités. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 5 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

Guetsky et al. (2002) ont montré qu'un effet à distance des agents biologiques comme *Bacillus mycoides* et *Pichia guillermondii* peut être le résultat d'une stimulation du système de défense de la plante de fraisier vis-à-vis de *B. cinerea*. Ainsi, les résultats obtenus dans notre étude peuvent suggérer la non implication de l'induction de résistance des fruits de pomme par les souches antagonistes Ach1-1 et 1112-3 vis-à-vis de *P. expansum*. Il est vrai que nos résultats ne montrent pas s'il y a induction de résistance à une échelle cellulaire (microscopique), par contre ils montrent qu'elle n'a pas d'impact significatif sur l'activité antagoniste. L'induction de résistance ne semble donc pas ici jouer un rôle dans l'effet protecteur vis-à-vis du pathogène. Une étude cytologique et ultrastructurale par microscopie électronique a permis d'observer que *Candida saitoana* induisait la formation de plusieurs structures de défense sur le tissus de pomme, comme la formation de papilles et d'autres protubérances (El-Ghaouth et al., 2003). Cependant, cette étude n'a pas mis en évidence la part de protection apportée par ces manifestations d'induction de résistance observées. Par ailleurs, dans le cas d'autres souches d'*A. pullulans* (L47 et LS-30), des auteurs ont montré qu'une importante activité -1,3-glucanase et chitinase a été présente dans les blessures des pommes traitées avec ces antagonistes. L'origine de ces enzymes a été attribuée à la

production par l'antagoniste lui-même et/ou à l'induction de l'accumulation de celles-ci dans les fruits (Ippolito et al., 2000 ; Castoria et al., 2001). Cependant, l'origine de ces enzymes et l'importance de leur contribution dans l'activité de biocontrôle des souches antagonistes restent encore inconnus et exigent plus d'investigation.

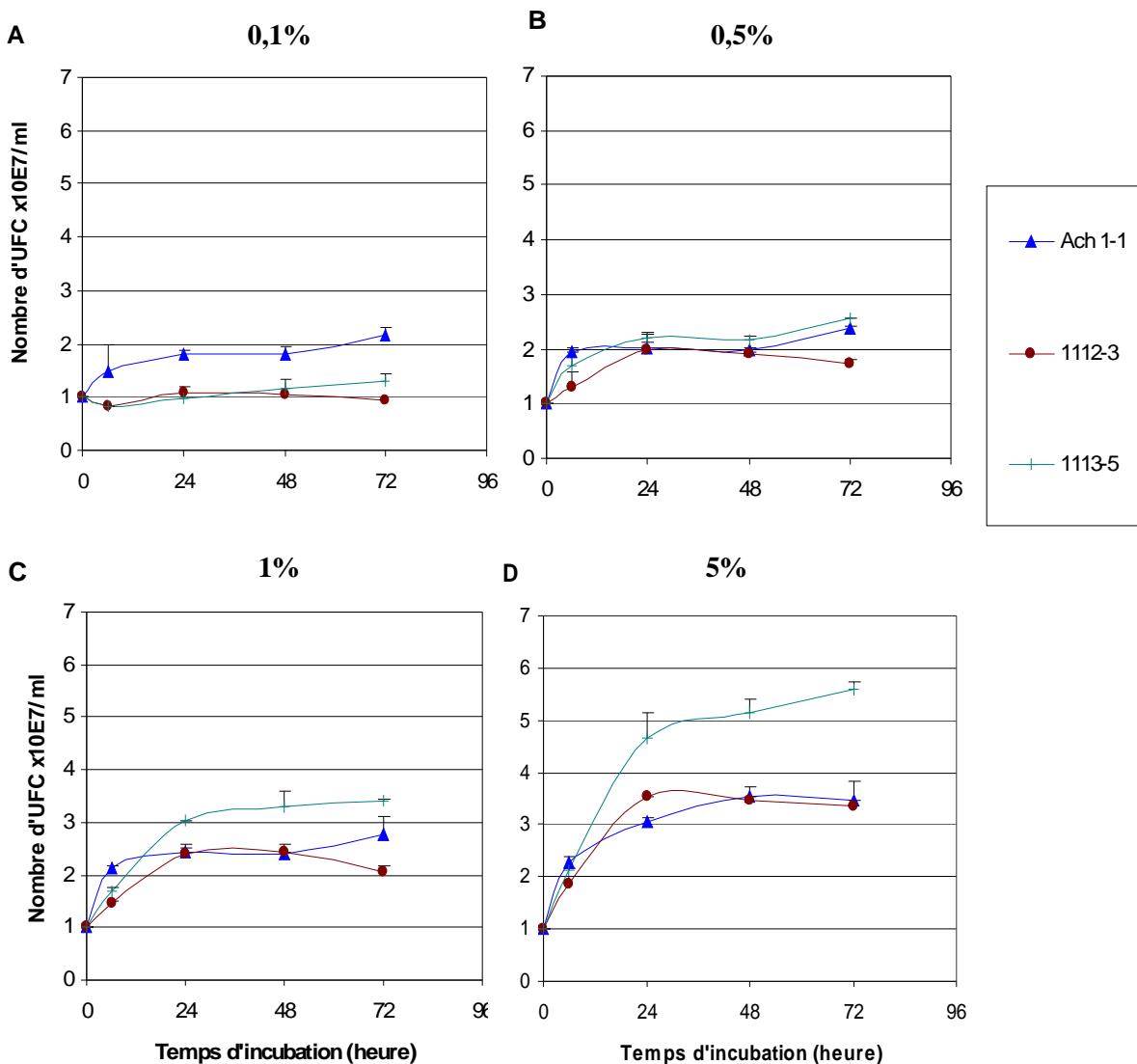
III- Etude in vitro de l'implication de la compétition pour la nutrition de souches d'*A. pullulans* dans l'inhibition de la germination des conidies de *P. expansum*

III.1- Cinétique de croissance des souches d' *A. pullulans* dans des milieux restreints en éléments nutritifs

L'objectif de cette étude est de pouvoir distinguer parmi plusieurs souches antagonistes d'*A. pullulans*, celles qui peuvent mieux se développer dans des conditions nutritionnelles restreintes et probablement servir comme un candidat compétiteur vis-à-vis de *P. expansum*.

Les graphiques 5 (A, B, C et D) représentent la cinétique de croissance des souches d'*A. pullulans* (Ach1-1, 1112-3, 1113-5) dans des milieux de jus de pomme dilué à des concentrations de 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5%, en partant d'une densité initiale des cellules de 10^7 UFC/ml. Les résultats ont montré qu'à la concentration la plus faible de jus (0,1%), l'ensemble des souches testées n'ont pas pu se développer, à l'exception de la souche Ach1-1 qui a atteint une densité de $2,18 \cdot 10^7$ UFC/ml après 72h d'incubation (Graphique 5A). Lorsque cette concentration a été portée à 0,5%, l'ensemble des populations des souches d'*A. pullulans* ont pu doubler leur densité après 24h d'incubation. Cependant, la vitesse de croissance a été différente d'une souche à une autre ; elle a été plus rapide dans le cas de la souche Ach1-1 qui a atteint cette densité ($2 \cdot 10^7$ UFC/ml) après 6 h d'incubation, suivie par la souche 1113-5 et enfin par la souche 1112-3 dont la densité a atteint seulement $1,3 \cdot 10^7$ UFC/ml après 6h d'incubation (Graphique 5B). L'augmentation de la concentration du jus à 1% et 5% dans les milieux de culture a amélioré la croissance des souches d'*A. pullulans* et plus particulièrement celle de la souche 1113-5 qui a atteint après 72h d'incubation des densités supérieures aux autres souches d'une valeur de $3,4 \cdot 10^7$ et $5,6 \cdot 10^7$ UFC /ml pour une concentration respective en jus de 1 et 5% (Graphique 5C et 5D). Il apparaît que le cycle de croissance des souches

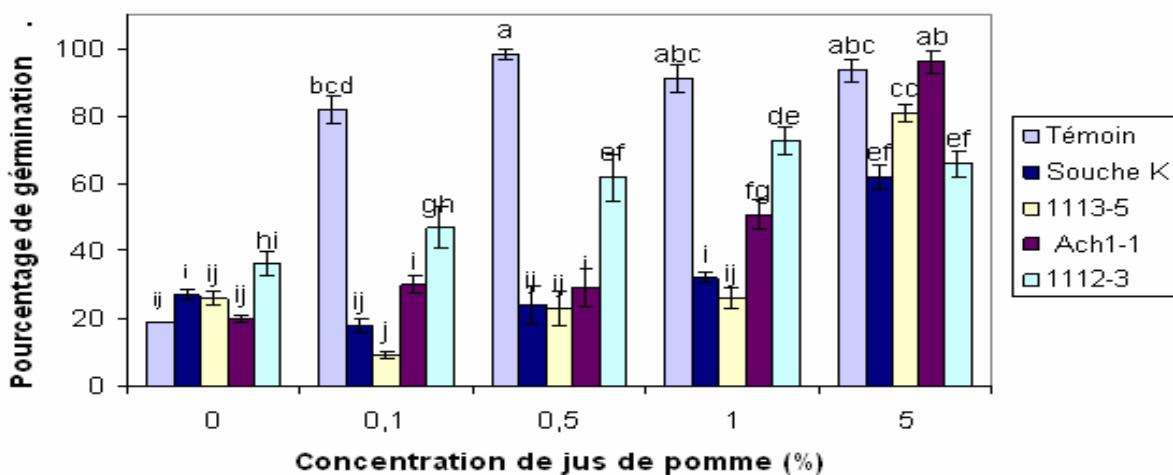
1113-5 et 1112-3 d'*A. pullulans* atteint la fin de la phase exponentielle après 24 h d'incubation pour atteindre la phase stationnaire qui est caractérisée par une croissance lente. Alors que pour la souche Ach1-1, la fin de la phase exponentielle est atteinte après 6 h d'incubation, excepté pour la concentration la plus élevée en jus (5%).



Graphique 5 : Cinétique de croissance *in vitro* des souches d'*A. pullulans* en fonction de la concentration du milieu de culture en jus de pomme 0,1% (A) ; 0,5% (B) ; 1% (C) et 5% (D). La densité initiale des souches est 10^7 UFC/ml. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 2 répétitions par objet. L'essai a été produit une fois dans le temps.

III.2- Etude de la compétition pour la nutrition *in vitro*

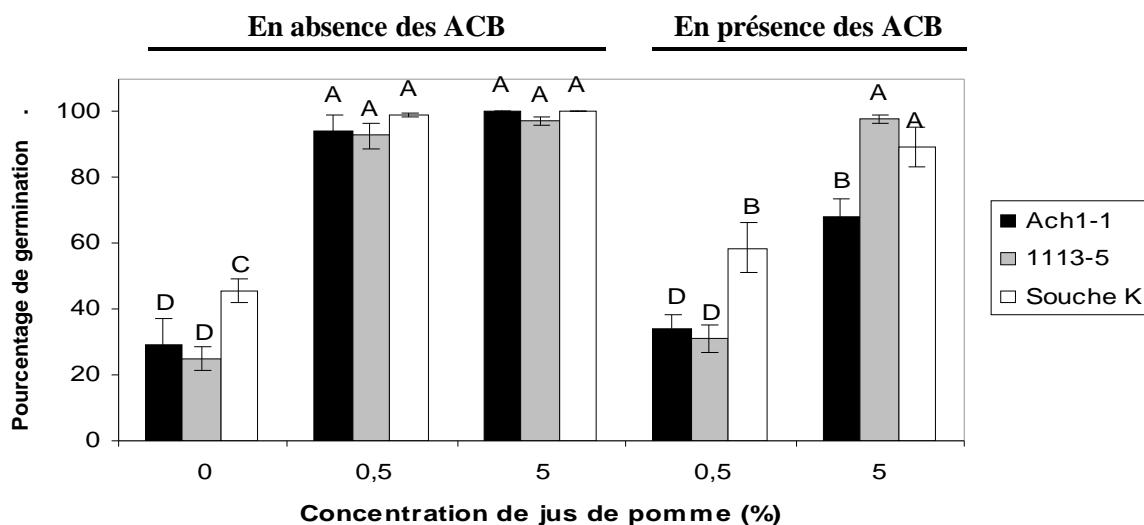
L'effet des souches antagonistes 1113-5, 1112-3 et Ach1-1 d'*A. pullulans* et de la souche K de *P. anomala* sur la germination des conidies de *P. expansum* a été étudié, dans des milieux de jus de pomme dilués à des concentrations croissantes (Graphique 6). L'analyse de la variance a montré un effet significatif de la concentration de jus et des souches antagonistes sur le pourcentage de germination des conidies. Le pourcentage le plus faible a été obtenu à une concentration de 0% de jus, en absence comme en présence des souches antagonistes. Pour les témoins, les conidies de *P. expansum* ont germé (82,5 - 98,5%) après les premières 24 h d'incubation en présence de jus (à toutes les concentrations testées) quoiqu'à 0,1% de jus, les conidies ont présenté une faible élongation du tube germinatif (Annexe 1). Cependant, la présence des souches Ach1-1, 1113-5 et la souche K a significativement réduit la germination des conidies comparativement aux témoins, dans le jus de pomme, sauf en présence de la concentration la plus élevée en jus (5%). En effet, à une concentration de 0,5% de jus, l'effet inhibiteur de ces trois souches antagonistes était le plus élevé avec des taux de réduction de germination par rapport aux témoins compris entre 70 et 76%. Alors qu'à 5% de jus, ces taux de réduction de germination étaient compris entre 0% (Ach1-1) et 32% (souche K) (Annexe 1). Des quatre souches testées, la souche 1112-3 d'*A. pullulans* a provoqué la plus faible baisse de germination avec un taux maximal de réduction de 37% par rapport au témoin, à une concentration de 0,5% de jus.



Graphique 6 : Le pourcentage de germination des conidies de *P. expansum* après 24h d'incubation sans (Témoin) ou avec les souches antagonistes d'*A. pullulans* (1113-5, Ach1-1 et 1112-3) ou de *P. anomala* (souche K) en fonction de la concentration de jus de pomme. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 2 répétitions par objet. L'essai a été produit 1 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$)

Afin d'évaluer la réversibilité de l'effet inhibiteur observé dans le cas des souches Ach1-1, 1113-5 et la souche K dans 0,5% de jus et pour vérifier la viabilité des conidies inhibées, ces dernières ont été remises dans des nouvelles conditions nutritives en absence ou en présence des antagonistes.

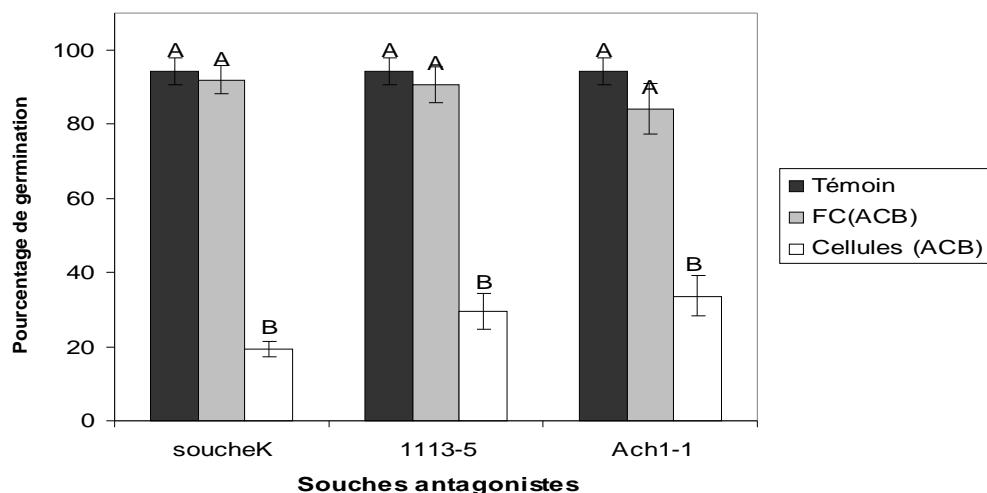
Quand les cylindres contenant les conidies inhibées (après 24h d'incubation à 0,5% de jus) ont été transférés dans des nouveaux puits contenant des concentrations croissantes (0 ; 0,5 ou 5%) de jus frais sans les souches antagonistes, la germination des conidies, après une incubation supplémentaire de 24h, est restée inchangée en absence de jus de pomme (0%) mais complètement rétablie en présence des deux concentrations de jus de 0,5 et 5% (Graphique 7). Par ailleurs, l'ajout de jus frais dans les puits contenant les conidies inhibées (après 24h d'incubation avec les antagonistes) pour obtenir une concentration de 0,5 % de jus n'a pas eu d'effet en présence des souches Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et a pu restaurer partiellement la germination des conidies en présence de la souche K de *P. anomala*. Alors qu'en portant cette concentration de jus à 5%, la germination des conidies a été totalement rétablie dans le cas de la souche K et de la souche 1113-5 et partiellement rétablie dans le cas de la souche Ach1-1; les pourcentages de germination étaient de 89 ; 98 et 68%, respectivement.



Graphique 7: Pourcentage de germination des conidies de *P. expansum* après 24h d'incubation en présence ou en absence des agents de contrôle biologique (ACB) (souches Ach1-1, 1113-5 et K) en fonction de la concentration de jus de pomme. Ces conidies ont été préalablement exposées à ces souches antagonistes dans 0,5% de jus de pomme pendant 24h. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 2 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$).

III.3- Evaluation de la présence des métabolites toxiques *in vitro*

Afin d'étudier l'éventuelle intervention des métabolites toxiques produits par les souches antagonistes Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et la souche K de *P. anomala*, dans l'effet inhibiteur de la germination des conidies de *P. expansum*, l'effet de filtrat de culture des souches antagonistes sur la germination des conidies a été évalué *in vitro* (Graphique 8).



Graphique 8 : Pourcentage de germination des conidies de *P. expansum* après 24 h d'incubation en présence des cellules des agents de contrôle biologique (ACB) souches Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et la souche K de *P. anomala* [Cellules (ACB)] ou de leur filtrat de culture [FC(ACB)] ou en absence de traitement [Témoin]. Le filtrat de culture provient d'une coculture préalable des cellules des antagonistes avec le pathogène *P. expansum* pendant 48h. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 2 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$)

Les analyses de la variance ont montré que l'application dans le milieu du filtrat de culture des trois souches antagonistes (Ach 1-1, 1113-5 et la souche K) n'a pas eu d'effet significatif sur la réduction du taux de germination par rapport au témoin non traité. Par contre la présence des cellules vivantes des antagonistes a engendré un effet inhibiteur important de la germination des conidies du pathogène par rapport au témoin non traité (Graphique 8).

III.4- Discussion

Les tests réalisés *in vitro* ont montré qu'en absence des souches antagonistes (témoins), la germination des conidies de *P. expansum* a été meilleure en présence qu'en absence de jus de pomme dans le milieu (Graphique 6). Ceci confirme que *P. expansum* est dépendant des éléments nutritifs du milieu et a besoin de suffisamment de nutriments pour germer et devenir infectieux. En effet, le pathogène *P. expansum* présente d'abord une phase saprophytique, en tant que nécrotrophe à la surface des fruits avant de développer une structure activement infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface (Blakeman et Brodie, 1977). Ainsi le développement, dans les sites des blessures, des antagonistes entrant efficacement en compétition pour les éléments nutritifs, peut prévenir l'établissement de cette phase saprophytique du pathogène et en conséquence réduire l'infection.

A la différence de la souche 1112-3, les souches antagonistes Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et la souche K de *P. anomala* ont eu un important effet inhibiteur de la germination des conidies de *P. expansum* *in vitro* après 24 h d'incubation dans des milieux faibles en jus de pommes et particulièrement à une concentration de 0,5% (Graphique 6). Ce faible effet inhibiteur de la souche 1112-3 peut être lié à une faible vitesse de croissance et d'assimilation des éléments nutritifs du milieu par rapport aux conidies du pathogène, pendant cette période. En effet, la cinétique de croissance des différentes souches antagonistes d'*A. pullulans* a montré qu'à une concentration de 0,5% de jus de pomme, la vitesse de croissance de la souche 1112-3, pendant les premiers 6 h d'incubation, a été la plus faible comparativement aux autres souches et particulièrement à la souche Ach1-1 (Graphique 5B). Selon Droby et Chalutz (1994), la croissance rapide d'un agent antagoniste peut intervenir dans la réduction des éléments nutritifs disponibles dans le milieu ou dans la restriction de l'espace pour la colonisation du pathogène, ce qui réduit la croissance de ce dernier et l'incidence de son infection. Toutefois, la méthode utilisée dans nos essais *in vitro* écarte l'effet de compétition pour l'espace et favorise plus la distinction de la compétition pour la nutrition, vu que le dispositif permet une séparation physique entre l'antagoniste et le pathogène avec un échange des éléments nutritifs du milieu. Ainsi, il semble que la souche 1112-3 d'*A. pullulans* n'agit pas principalement dans son activité de biocontrôle vis-à-vis de *P. expansum* par la compétition pour les éléments nutritifs des pommes mais par d'autres mécanismes qui demanderaient plus d'investigation.

Par ailleurs, l'effet inhibiteur de la germination des souches antagonistes Ach1-1 et 1113-5 et la souche K a presque disparu dans un milieu riche en jus (à une concentration de 5%) (Graphique 6), ce qui montre que ces agents biologiques étaient efficaces dans l'inhibition de la croissance de *P. expansum* seulement dans des conditions restreintes en éléments nutritifs. De plus, cet effet inhibiteur était réversible et les conidies inhibées étaient encore viables puisqu'elles étaient toujours capables de germer une fois remises dans des conditions nutritives favorables, en absence ou même en présence des antagonistes si la concentration du milieu en éléments nutritifs est élevée (Graphique 7). Ceci constitue des preuves de la possibilité d'implication importante de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste des souches Ach1-1 et 1113-5 d'*A. pullulans* et de la souche K de *P. anomala* vis-à-vis de *P. expansum* (Droby et al., 1989 ; Janisiewicz et al., 2000 ; Meziane et al., 2006). Ces résultats confirment ceux obtenus par Jijakli (1996) qui a montré que la compétition pour la nutrition peut constituer l'un des principaux mécanismes d'action de la souche K de *P. anomala* vis-à-vis de *B. cinerea* sur pomme. D'autres recherches ont également montré que des souches d'*A. pullulans* (L47, ST1-A24 et LS-30) agissent principalement par le mécanisme de la compétition pour la nutrition vis-à-vis de *B. cinerea* et de *P. expansum* (Lima et al., 1997 ; Janisiewicz et al., 2000 ; Castoria et al., 2001).

Le système des plaques avec inserts utilisé dans notre étude *in vitro*, présente de nombreux avantages qui permettent d'étudier le mécanisme de la compétition pour la nutrition, indépendamment de la compétition pour l'espace (comme la séparation physique entre l'antagoniste et le pathogène, la possibilité de transférer les conidies du pathogène d'un milieu à un autre d'une manière non destructive) (Janisiewicz et al., 2000). Cependant, ce système ne permet pas d'écartier l'effet des métabolites toxiques qui peuvent être sécrétés par les antagonistes dans le milieu et diffuser à travers la membrane vers les conidies du pathogène. Ainsi pour lever cette hypothèse, une expérience supplémentaire qui consiste à analyser l'effet du filtrat de culture des agents antagonistes (préalablement cultivés avec le pathogène pendant 48h) sur l'inhibition de la germination des conidies du pathogène a permis de démontrer l'absence significative d'un effet lié à une sécrétion dans le milieu de métabolites toxiques par les trois antagonistes (souches Ach1-1, 1113-5 et la souche K). En ce qui concerne la souche K, il a été montré partiellement qu'elle ne produit pas d'antibiotiques ou de toxines vis-à-vis des pathogènes de post-récolte des pommes en utilisant la technique de culture en duales *in vitro* (Jijakli, données non publiée). Par ailleurs, l'utilisation d'une méthode biochimique a permis d'isoler un exo-?-1,3-glucanase à partir des filtrats de culture

de la souche K en présence des parois de *B. cinerea*. Cette enzyme purifiée a montré un important effet inhibiteur de la croissance des tubes germinatifs des conidies de *B. cinerea* par la dégradation partielle ou totale des parois du pathogène. En outre, l'addition des parois de *B. cinerea* stimulait à la fois cette activité enzymatique et l'activité protectrice vis-à-vis du pathogène. Ces études suggéraient que l'activité enzymatique pourrait être l'un des mécanismes d'action impliqué dans l'effet protecteur de *P. anomala* souche K vis-à-vis de *B. cinerea* (Jijakli et Lepoivre, 1998). Alors qu'en ce qui concerne *A. pullulans*, il a été détecté des activités Nagase et ?-1,3-glucanase dans les filtrats de culture d'une autre souche (LS-30) (Castoria, et al., 2001). Ainsi, nos résultats ne confirment pas l'absence totale d'une activité enzymatique ou même antibiotique dans les filtrats de cultures des souches antagonistes testés. Par contre ils montrent que ces activités ne jouent pas un rôle significatif dans l'effet inhibiteur de la germination des conidies de *P. expansum*.

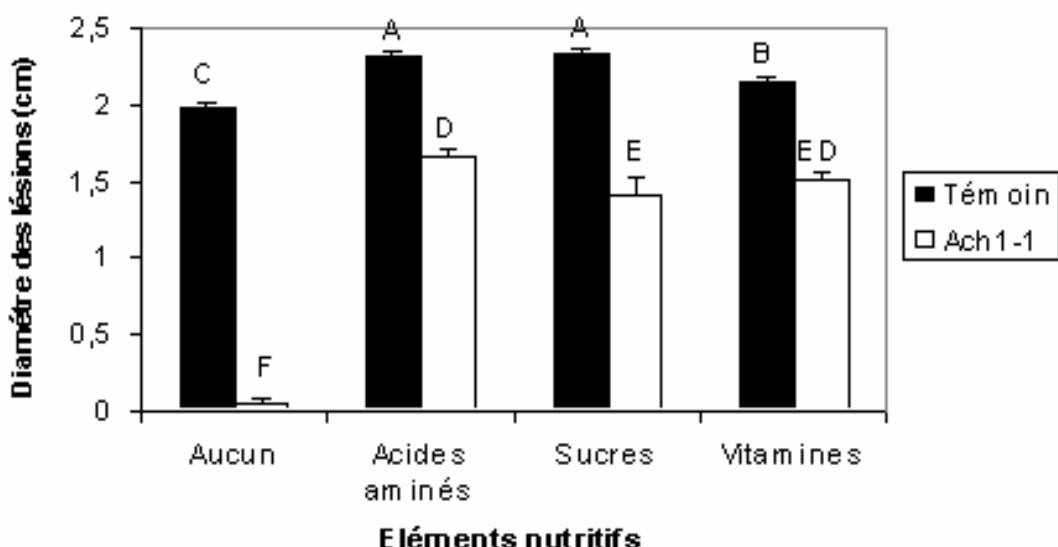
IV- Evaluation in situ de l'implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans*

IV.1- Compétition pour les éléments nutritifs des pommes

En absence des éléments nutritifs exogènes, la souche Ach1-1 a montré une grande efficacité dans la réduction des diamètres des lésions causées par *P. expansum* sur les pommes blessées (Graphique 9). Le taux d'efficacité correspondant était de 97,1%. Pour les témoins non traités, l'ajout des éléments nutritifs (acides aminés, sucres et vitamines) en excès dans les blessures des pommes a significativement augmenté le diamètre des lésions. Pour les objets traités avec la souche Ach1-1, l'application des éléments nutritifs a fortement élargi les lésions causées par le pathogène (Graphique 9) et a réduit l'efficacité de la souche antagoniste. Par rapport à leur témoin respectif, les niveaux d'efficacité apportés par la souche Ach1-1 en présence de sucres, de vitamines ou d'acides aminés étaient respectivement de 39,8 ; 29,4 et 28,4%.

L'analyse de la variance des résultats de deux essais réalisés séparément dans le temps a montré une différence significative, ce qui n'a pas permis de regrouper les résultats dans un

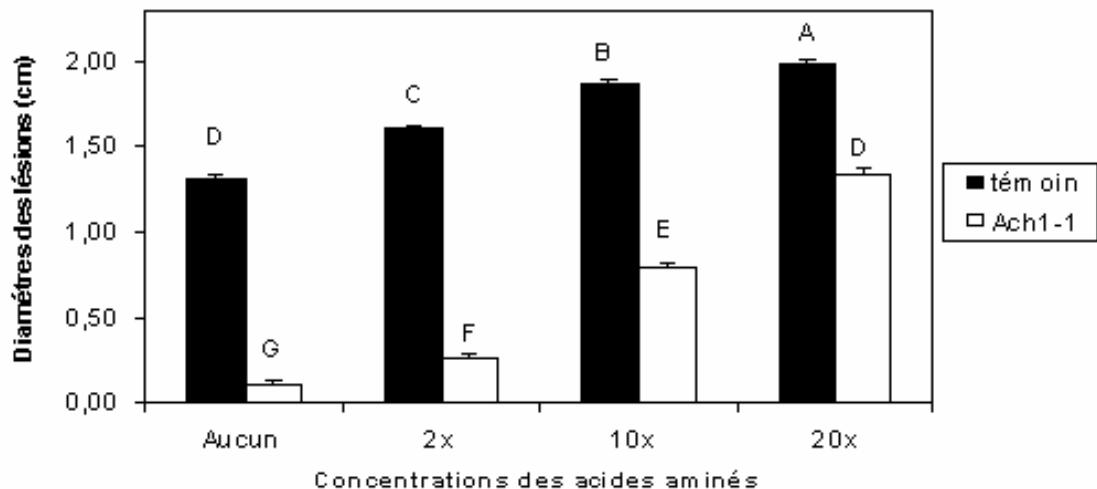
seul graphique (Annexes 2 et 3). Néanmoins, la tendance des deux essais a été la même ; ainsi la plus importante réduction du taux d'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum*, a été obtenue avec les acides aminés (71-78%) suivis par les vitamines (51-70%) et finalement par les sucres (38-60%) (Graphique 9 et annexe 2).



Graphique 9 : Effet de l'application exogène des sucres, des vitamines ou des acides aminés dans les blessures des pommes sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum* en absence (témoin) ou en présence d'*A. pullulans* (Ach1-1) après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 45 répétitions par objet. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$) (1ère répétition dans le temps).

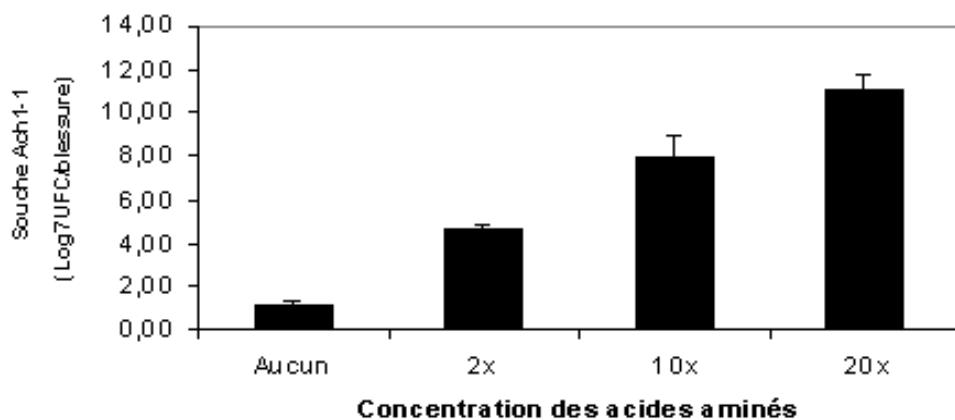
IV.2- Compétition pour les acides aminés des pommes

L'ajout des concentrations croissantes en acides aminés dans les blessures des pommes non traitées (témoins) ou traitées avec la souche Ach1-1 a significativement élargi le diamètre des lésions développées par *P. expansum* (Graphique 10). La présence de la souche Ach1-1 a significativement réduit le diamètre de l'infection par rapport au témoin quelle que soit la concentration en acides aminés. Cependant, l'importance de cette réduction a diminué avec l'augmentation de la concentration des acides aminés, s'accompagnant donc d'une perte du niveau d'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum*. La plus importante perte a été obtenue avec l'application de la concentration la plus élevée des acides aminés 20x. Ainsi par rapport à leur témoin respectif, 32,8% d'efficacité a été enregistrée lors de l'application de la concentration 20x en acides aminés contre 91% obtenue sans ajout d'acides aminés (Graphique 10).



Graphique 10 : Effet de l'application exogène des acides aminés dans les blessures des pommes sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum* en absence (témoins) ou en présence de la souche antagoniste Ach1-1 après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 45 répétitions par objet. L'essai a été répété 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$)

Le graphique 11 montre l'effet de l'application des acides aminés sur la croissance de la population de la souche antagoniste Ach1-1 après 24 h d'incubation dans les blessures des pommes. La densité de la population de la souche a significativement augmenté en fonction de la concentration des acides aminés ajoutés. La densité la plus importante a été obtenue avec la concentration des acides aminés la plus élevée (20x).



Graphique 11 : Effet de l'application exogène des acides aminés dans les blessures des pommes sur la densité de la population de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* (10^7 UFC/blessure) après 24 h d'incubation. Les barres verticales représentent l'E.S calculée à partir de 5 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps.

IV.3- Discussion

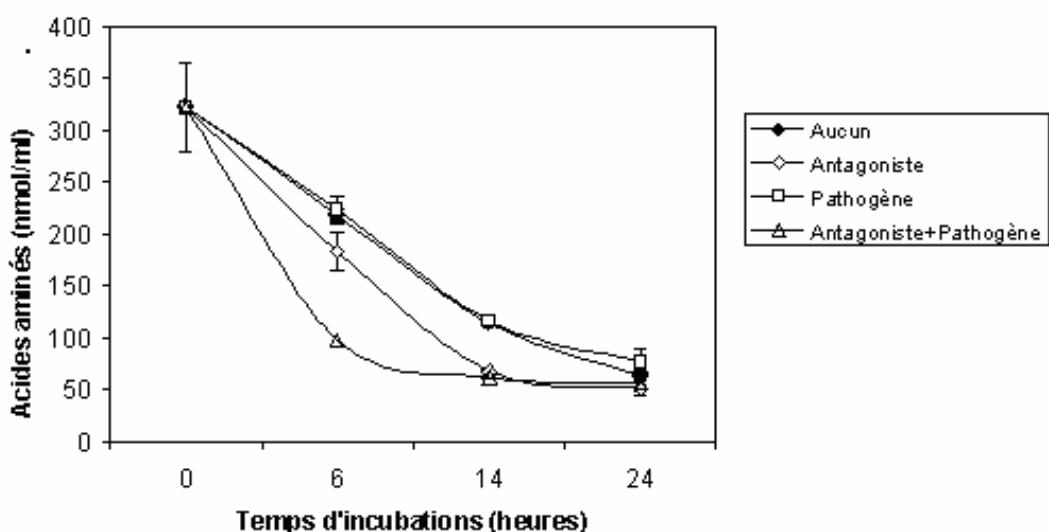
L'étude du mécanisme de la compétition pour la nutrition *in vitro* a été complétée avec une étude *in vivo* sur des pommes blessées, dans le cas de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans*. Les résultats obtenus ont encore une fois confirmé l'efficacité de cette souche antagoniste dans le contrôle biologique des infections des blessures dues au *P. expansum* avec des niveaux d'efficacité allant de 83 à 97% selon les essais (Graphiques 9 et 10). Cependant, cet effet de protection a été fortement réduit avec l'ajout dans les blessures d'éléments nutritifs exogènes des pommes (Graphique 9, 10, annexe 2), montrant ainsi, que l'effet antagoniste peut être réversible, même *in vivo*, en présence d'un excès d'éléments nutritifs. Ce qui confirme l'hypothèse de l'implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans le contrôle de *P. expansum* par la souche antagoniste Ach1-1. Cette approche a été utilisée par de nombreux auteurs travaillant sur la lutte biologique au moyen des antagonistes contre les pathogènes de post-récolte des fruits (Filonow, 1996 ; Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Lima et al., 1997 ; Vero et al., 2002, Saligkarias et al., 2002 ; Saravanakumar et al., 2008). Cependant ils ont souvent eu recours à l'utilisation des milieux synthétiques comme nutriments exogènes (NYDB (Nutrient Yeast Dextrose Broth) et Nitrate de Potassium) dont les compositions sont différentes de celle de tissus des pommes (Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Lima et al., 1997 ; Vero et al., 2002). Alors que dans notre étude, les nutriments exogènes ajoutées dans les blessures des pommes sont conformes à ce qui est rapporté dans le tissus des pommes, tant au niveau composants qu'au niveau quantités. (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001). Ce qui permet de montrer l'effet de surplus d'un élément propre aux pommes sur l'activité antagoniste.

Parmi les principaux composants des pommes qui ont été testés, les acides aminés paraissent être, dans nos conditions expérimentales, plus impliqués dans la compétition entre la souche Ach1-1 et *P. expansum* que les vitamines et particulièrement plus que les sucres (Graphique 9, annexe 2). En outre, l'application exogène d'acides aminés à des concentrations croissantes dans les blessures des pommes a progressivement réduit l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* (Graphique 10) sans réduire le développement de ces microorganismes (l'antagoniste et le pathogène) (Graphiques 10 (témoins) et 11). En effet, l'ajout dans les blessures de la concentration la plus élevée des acides aminés (20x) a réduit le niveau d'efficacité de 64%, indiquant ainsi que plus la source d'azote est importante dans les sites de compétition plus il y a une suppression de l'effet antagoniste de la souche

Ach1-1. Une autre étude a déjà montré qu'une suppression de l'activité de biocontrôle de deux levures *Cryptococcus laurentii* et *Candida ciferrii* vis-à-vis de *P. expansum* a été obtenue avec l'addition de nitrate de potassium dans les sites des blessures des pommes, plutôt qu'avec l'addition des sucres, indiquant ainsi que les composés azotés, qui sont présents en faible concentration dans les pommes, sont limitants pour le développement des levures et du pathogène (Vero et al., 2002). Ces observations montrent que la compétition pour la nutrition et plus particulièrement celle pour les acides aminés peut jouer un rôle important dans le contrôle biologique de *P. expansum*.

V- Analyse de l'assimilation des acides aminés des pommes par l'antagoniste et/ou le pathogène par chromatographie en phase liquide

L'analyse par HPLC de la cinétique de l'assimilation des acides aminés existants dans les blessures des pommes a indiqué que la concentration totale de ces composés diminue durant l'incubation des pommes, essentiellement durant les premières 14 h suivant l'application de l'antagoniste Ach1-1 (Graphique 12). La plus importante réduction a été observée dans les blessures traitées avec la souche Ach1-1 et plus particulièrement dans celles contenant la souche Ach1-1 et *P. expansum*.



Graphique 12 : Concentration (nmol /ml) de l'ensemble des acides aminés présents dans les blessures des pommes durant les premiers 24 h d'incubation. Les blessures étaient intactes (Aucun), traitées avec la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* seule (Antagoniste), inoculées avec *P. expansum* seul (Pathogène) ou traitées avec la souche Ach1-1 et ensuite inoculées avec *P. expansum* (Antagoniste + Pathogène). Les barres verticales représentent l'E.S calculée à partir de 2 répétitions par objet. L'essai a été réalisé 1 fois dans le temps.

L'analyse détaillée des données obtenues a permis de classer les différents acides aminés analysés en trois groupes selon le changement de leur concentration individuelle durant l'incubation (Tableau 2, Annexe 4). Le premier groupe comprenait la serine, la glycine et l'acide glutamique dont les concentrations ont largement diminué avec le temps de l'incubation. Le second groupe se composait des acides aminés suivants : acide aspartique, histidine, arginine, thréonine, alanine et proline, dont les concentrations restaient presque stables durant l'incubation. Le reste des acides aminés analysés (tyrosine, valine, méthionine, lysine, leucine, tryptophane et phénylalanine) ont constitué le troisième groupe. Les acides aminés appartenant à ce groupe existaient en très faible concentration dès le départ de l'expérimentation (Annexe 4).

Dans les conditions expérimentales de l'analyse par HPLC, l'essai de biocontrôle réalisé en parallèle a montré une grande efficacité de la souche antagoniste Ach1-1 sur la réduction du diamètre des lésions causées par *P. expansum* en assurant un niveau d'efficacité de 84% (Annexe 5).

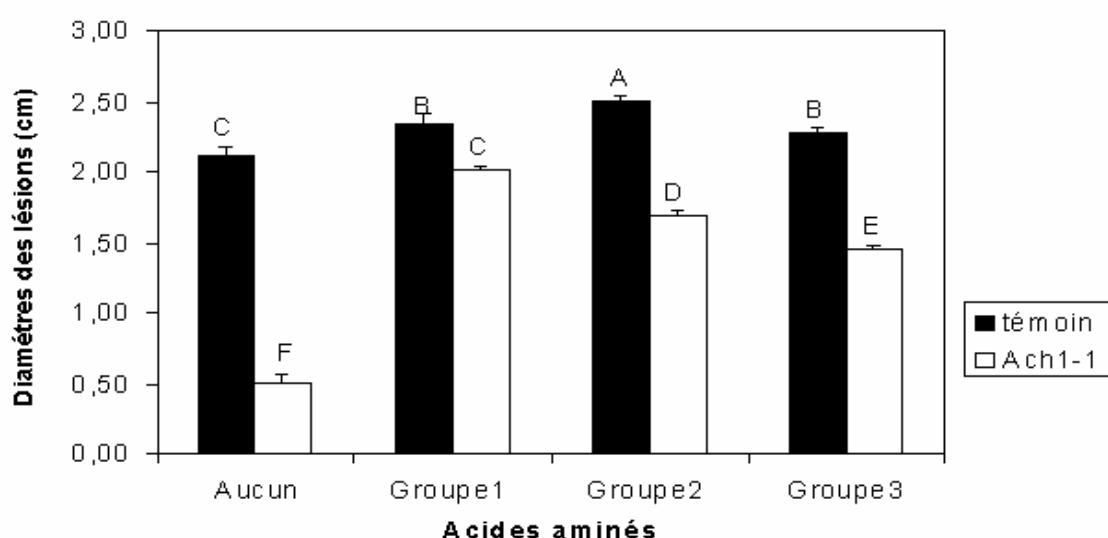
Ainsi, l'hypothèse de l'implication de la compétition pour les acides aminés dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* a été renforcée par l'analyse de la cinétique de l'épuisement des acides aminés des blessures durant l'incubation des pommes. Cette analyse a dévoilé que la concentration des acides aminés se trouve plus réduite, après l'incubation, en présence de la souche Ach1-1 qu'en présence de *P. expansum* et que l'épuisement le plus rapide des acides aminés a été obtenu en présence des deux microorganismes (Graphique 12). Ceci suggère que la souche Ach1-1 assimile les acides aminés des pommes mieux que *P. expansum*, et plus particulièrement ceux appartenant au groupe 1 (la serine, la glycine et l'acide glutamique) (Annexe 4). La serine et l'acide glutamique ont été trouvés parmi les trois principaux acides aminés présents dans le jus de pomme qui ont été complètement assimilés durant 24 h d'incubation par une autre souche d'*A. pullulans* (ST1-A24) *in vitro* (Janisiewicz et al., 2000). Ainsi, ces acides aminés du groupe 1 peuvent être plus impliqués que les autres dans le mécanisme de compétition.

VI - Compétition pour des acides aminés spécifiques

VI.1- Compétition *in vivo* pour des groupes d'acides aminés

L'analyse statistique de la variance a montré que les diamètres des lésions développées par *P. expansum* ont été significativement affectés par l'ajout des groupes des acides aminés (Tableau 2). Pour les témoins, les valeurs des diamètres des lésions étaient plus importantes en présence qu'en absence des acides aminés exogènes indépendamment des groupes utilisés. En présence de la souche Ach1-1, l'ajout des acides aminés a significativement élargi les lésions et a réduit son effet antagoniste. La plus importante perte d'efficacité vis-à-vis de *P. expansum* a été obtenue avec le premier groupe (serine, glycine et acide glutamique) avec un taux de 81,4% par rapport au témoin suivi par le groupe 2 (57,4%) et finalement par le groupe 3 (52,1%) (Graphique 13).

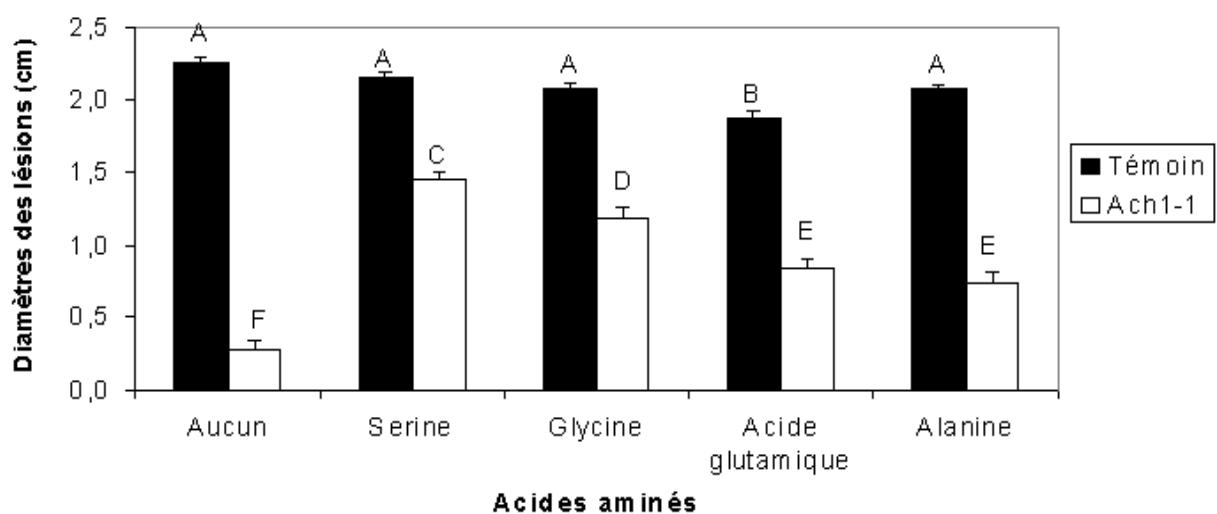
Afin de trouver l'élément le plus limitant dans cette compétition, les acides aminés appartenant au groupe 1 (serine, glycine et acide glutamique) ont été choisis pour être testés individuellement dans les essais de biocontrôle, en comparaison avec un élément du deuxième groupe (alanine) (Paragraphe VI.2).



Graphique 13 : Effet de l'application exogène des différents groupes des acides aminés dans les blessures des pommes sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum* en absence (témoins) ou en présence d'*A. pullulans* (souche Ach1-1) après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent l'E.S calculée à partir de 45 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$)

VI.2- Compétition *in vivo* pour des acides aminés individuels

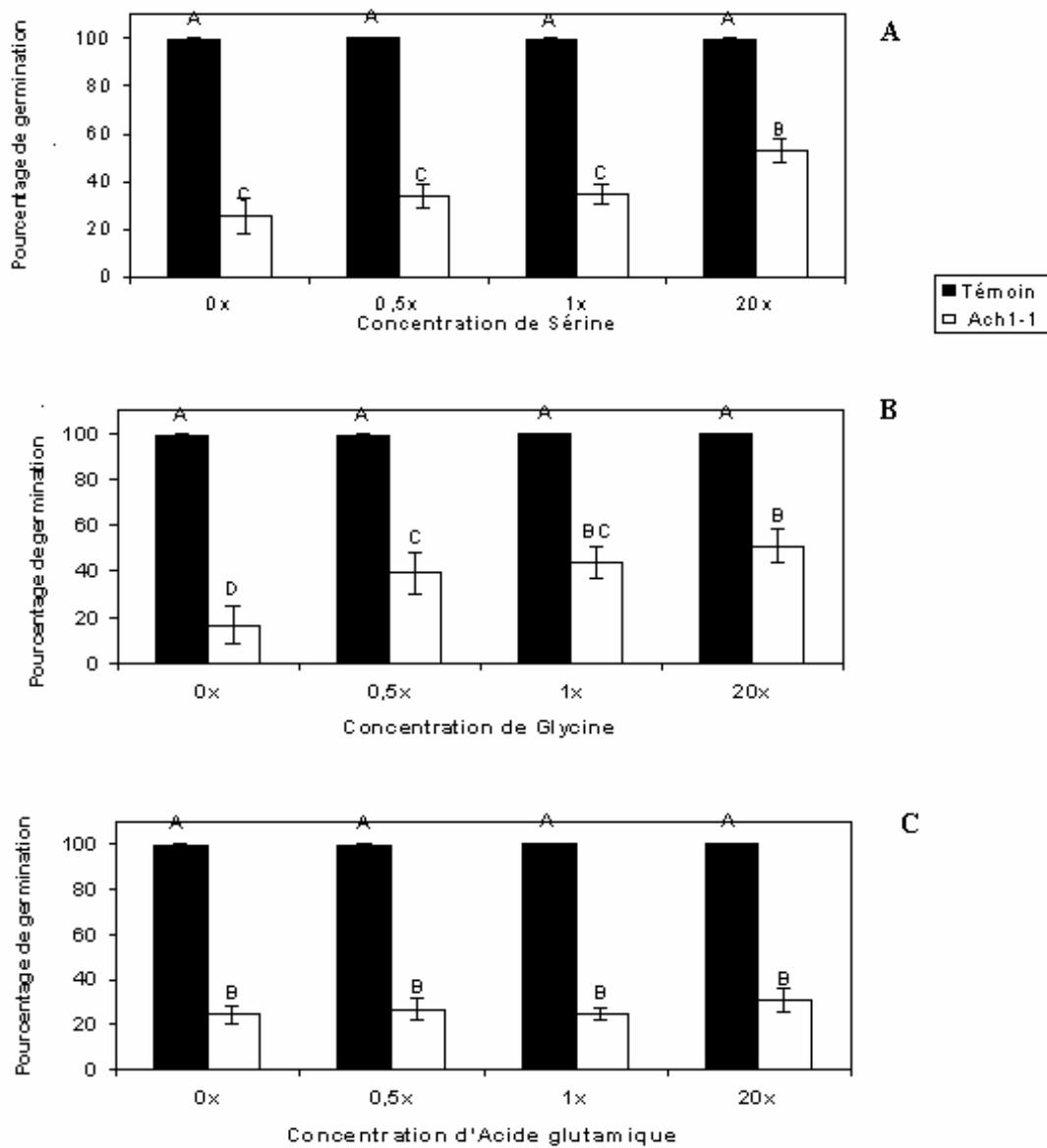
Pour les témoins non traités avec la souche antagoniste Ach1-1, l'ajout de chacun des acides aminés individuels en excès dans les blessures des pommes n'a pas affecté les diamètres des lésions causées par *P. expansum* (Graphique 14). L'application de la souche antagoniste Ach1-1 a significativement contrôlé le développement du pathogène par rapport au témoin en présence ou en absence d'ajout des acides aminés. Cependant, le niveau de cet effet a été significativement réduit par l'ajout de chacun des acides aminés testés. La plus importante perte d'efficacité a été obtenue en appliquant l'acide aminé serine (62,8%), suivis par la glycine (51,1%), ensuite par l'acide glutamique (37,2%) et lalanine (26,4%). Par ailleurs, l'analyse statistique n'a pas montré une différence significative entre l'effet de l'ajout de l'acide glutamique et lalanine sur le diamètre des lésions.



Graphique 14 : Effet de l'application exogène des acides aminés serine, glycine, acide glutamique et alanine dans les blessures des pommes sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum* en absence (témoign) ou en présence de *A. pullulans* (souche Ach1-1) après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent l'E.S calculée à partir de 45 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$)

VI.3- Effet *in vitro* des acides aminés spécifiques sur la germination des conidies du pathogène

Les graphiques 15 A, B et C représentent l'effet de l'application de trois acides aminés (sérine, glycine et acide glutamique) sur le pouvoir inhibiteur de la souche antagoniste Ach1-1 de la germination des conidies du pathogène *P. expansum*. Ceci après 24 heures d'incubation, dans un milieu minimal qui ne contient aucune source d'azote.



Graphiques 15 A, B et C : Pourcentage de germination des conidies de *P. expansum* après 24 heures d'incubation dans un milieu synthétique contenant différentes concentrations en acides aminés Serine (A), Glycine (B) ou Acide glutamique (C), en absence (Témoin) ou en présence de l'antagoniste (Ach1-1). Les barres verticales représentent l'E.S calculée à partir de 2 répétitions par objet. L'essai a été reproduit 2 fois dans le temps. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$)

En absence de la souche antagoniste Ach1-1, les conidies de *P. expansum* ont pu totalement germer dans le milieu synthétique, même sans ajout des acides aminés (graphique 15). L'addition de la souche Ach1-1 dans le milieu a significativement réduit le taux de germination du pathogène quelle que soit la concentration et l'acide aminé présent dans le milieu. L'effet inhibiteur de la souche Ach1-1 a été affaibli en présence d'une concentration élevée de la sérine (20 x), alors qu'il est resté invariable avec des concentrations correspondantes à 0,5 et 1 fois la quantité qui existe naturellement dans les pommes. Ainsi, dans un milieu contenant 20x de sérine, le taux d'inhibition de la souche Ach1-1 était de 47% contre 75% obtenu sans l'ajout de sérine (Graphique 15A). Dans le cas de la glycine, une réduction significative de l'effet inhibiteur de la souche antagoniste a été observée dès l'ajout de la première concentration (0,5x) et elle a été plus importante avec la concentration la plus élevée (20x) (Graphique 15B). Par contre dans le cas de l'acide glutamique, les concentrations testées n'ont pas eu d'effet significatif sur le pouvoir inhibiteur de la souche Ach1-1 (Graphique 15 C).

VI.4- Discussion

L'objectif de cette partie est de trouver parmi les acides aminés des pommes, ceux qui sont les plus limitants dans le mécanisme de la compétition pour la nutrition qui est impliqué dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* sur pomme.

Les acides aminés du groupe 1 (sépine, glycine et acide glutamique) ont eu un important effet sur la réduction de l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 quand ils sont appliqués en groupe avec une importante concentration dans les blessures des pommes, comparativement aux autres groupes d'acides aminés des pommes (Graphique 13). Ainsi ces observations sont en corrélation avec les résultats de la cinétique d'épuisement des acides aminés dans les blessures des pommes, qui ont montré que les acides aminés du groupe 1 ont été les plus assimilés par l'antagoniste et le pathogène (annexe 4).

Par ailleurs, en testant l'effet individuel de chacun des acides aminés du groupe 1, il est constaté que seulement deux acides aminés (sépine et glycine) ont eu un effet significatif sur la perte d'effet inhibiteur de la souche antagoniste par rapport à un élément du groupe 2

(alaline) (graphique 14). Ainsi, ces acides aminés et particulièrement la sérine pourraient être les éléments les plus impliqués dans le mécanisme de la compétition.

Dans le milieu synthétique minimal en absence d'acides aminés, les conidies de *P. expansum* étaient capables de germer totalement et la souche antagoniste Ach1-1 pouvait avoir un important effet inhibiteur de la germination des conidies du pathogène (Graphiques 15). Ceci indique que les acides aminés ne sont pas les seuls éléments limitants dans la compétition. Il se peut que d'autres éléments qui existent dans le milieu minimal soient également limitants dans cette compétition. En effet, ce milieu contient d'autres éléments qui existent naturellement dans les pommes et qui sont indispensables dans le métabolisme des microorganismes, comme le glucose et certains sels minéraux (Fer, potassium, magnésium et manganèse) (Filonow, 1998 ; Guinebretiere et al., 2000 ; Saravanakumar et al, 2008). Il a été rapporté que sur les blessures des pommes, la compétition pour le fer jouait un rôle important dans l'activité antagoniste d'une levure *Metchnikowia pulcherrima* vis-à-vis de *B. cinerea* (Saravanakumar et al., 2008). Par ailleurs, la présence de la sérine ou de la glycine dans les milieux avec des concentrations élevées (20x) a réduit considérablement l'effet inhibiteur de la souche Ach1-1 (Graphique 15 A et B), ce qui a permis de confirmer les résultats obtenus *in vivo*.

A partir de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la sérine et la glycine soient parmi les acides aminés les plus limitants dans le mécanisme de compétition entre l'agent antagoniste Ach1-1 d'*A. pullulans* et le pathogène de post-récolte des pommes *P. expansum*. Néanmoins, ceci ne peut écarter la possibilité de l'implication d'autres éléments nutritifs dans le mécanisme de compétition.

CHAPITRE V :
DISCUSSION GENERALE ET
CONCLUSIONS

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

La souche Ach1-1 d'*A. pullulans* est un nouvel agent de contrôle biologique potentiel vis-à-vis de la pourriture bleue des pommes en post-récolte. Elle a fait l'objet de plusieurs travaux dans le cadre du projet de coopération PIC, par différents partenaires (développement de méthode de traçage, étude écologique, production et formulation, essais pilote d'efficacité et des essais pratiques) (Rapport PIC 2006, données non publiés). La compréhension de ses modes d'action constitue une étape important et nécessaire pour maximiser l'utilisation potentielle de cette souche.

Le présent travail s'est donc intéressé à analyser l'implication des principaux modes d'action dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum*. La première partie a permis d'étudier l'importance de la part des trois mécanismes d'action dans cette activité antagoniste et de sélectionner le mécanisme le plus apparent : la compétition pour la nutrition qui a été étudié plus en profondeur dans la seconde partie de ce travail.

Le mécanisme de la compétition pour la nutrition a été largement rapporté dans le cas de contrôle biologique des maladies de post-récolte (Castoria et al., 1997 ; Castoria et al., 2001 ; Lima et al., 1997 ; Vero et al., 2002, Saligkarias et al., 2002 ; Saravanakumar et al, 2008). Selon la littérature (Castoria et al., 1997, 2001; Lima et al., 1997; Janisiewicz et al., 2000; Guetsky et al., 2002; Vero et al., 2002), les études relatives à ce mécanisme sont caractérisées par : (1) l'utilisation des approches ou bien *in vitro* ou *in situ* mais pas les deux ensembles, (2) une confusion entre la partie relative à l'implication de la compétition pour la nutrition et celle relative à l'espace, et (3) l'utilisation souvent, dans les essais *in situ*, d'un milieu synthétique comme le NYDB (Nutrient Yeast Dextrose Broth) dont la composition est différente de celle des tissus de pomme. Alors que dans notre étude, la stratégie adoptée était d'abord d'examiner son implication dans les conditions *in vitro* en utilisant un système qui permet la distinction entre la compétition pour la nutrition et pour l'espace en milieu composé de jus de pomme, ensuite de compléter l'étude par des essais de protection *in situ* en utilisant des concentrations élevées des composants majeurs de la pomme (acides aminés, sucres et vitamines) ainsi que par des analyses chromatographiques de la dégradation des éléments spécifiques dans les blessures des pommes. Cette approche biochimique a été appliquée dans les conditions réelles de la culture en confrontant l'antagoniste et le pathogène dans les

blessures de pommes, ce qui constitue l'originalité de cette recherche en comparaison avec d'autres études dont les analyses chromatographiques par HPLC ont été utilisées dans la mesure de la consommation des sucres ou des acides aminés par les antagonistes dans un milieu de jus *in vitro*, sans prendre en considération l'effet de la présence du pathogène sur la compétition (Guinebretiere et al., 2000 ; Janisiewicz et al., 2000).

En général, les approches expérimentales utilisées dans l'étude du mécanisme de la compétition pour la nutrition sont de type biologique ou biochimique. Elles consistent à mettre en évidence indirectement l'implication du mécanisme d'action dans l'activité antagoniste mais sans le démontrer concrètement avec des preuves directes. Par ailleurs, les progrès en biologie moléculaire ont permis de développer des outils qui sont capables d'isoler et d'étudier l'implication directe d'un composé spécifique (ou d'un mode d'action) dans les propriétés antagonistes d'un agent de contrôle biologique. Néanmoins l'utilisation de cette approche reste encore très difficile dans le cas du mécanisme de la compétition pour la nutrition, notamment à cause du caractère polygénique de ces propriétés nutritives et du fait qu'elle mette en jeu des fonctions impliquées dans le métabolisme de base du microorganisme (Jijakli, 2003).

L'étude des mécanismes d'action de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* a été réalisée au début en comparaison avec d'autres souches antagonistes de la même espèce (1113-5 et 1112-3) et d'une souche de référence *P. anomala* souche K. L'intérêt de cette comparaison est d'essayer de mettre en évidence des réactions éventuellement différentes entre les souches antagonistes. Ainsi, il s'est avéré que la souche 1112-3 montre un faible effet inhibiteur de la germination des conidies du pathogène *in vitro* comparativement à la souche Ach1-1 (graphique 6), même si les deux souches présentent des niveaux de protection presque similaires sur pomme (graphique 2). Cette différence de comportement peut être liée à des modes d'action distincts, qui nécessitent plus d'investigation pour être élucidés. Ensuite, l'étude a été plus spécifique à la souche Ach1-1 afin de pouvoir approfondir l'analyse du mécanisme de la compétition pour la nutrition.

A partir des résultats obtenus, la présente étude a permis de montrer que l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* n'est pas liée essentiellement à la sécrétion des métabolites toxiques par l'antagoniste dans le milieu ou à

l’induction de la résistance de fruit. Néanmoins, l’implication partielle de ces mécanismes ne peut être totalement écartée.

La potentialité de la souche Ach1-1 dans l’inhibition de la germination des conidies de *P. expansum* et dans la réduction de la sévérité des lésions dues au pathogène sur les blessures des pommes ne peut être importante que dans des conditions restreintes en éléments nutritifs et peut être réversible en présence d’un surplus exogène en nutriments des pommes. Ainsi, cette souche antagoniste n’altère pas la viabilité du pathogène et agit par une compétition efficace pour les éléments nutritifs des pommes.

Les acides aminés des pommes sont parmi les composants les plus limitants dans cette compétition. Leur présence en excès dans les sites des blessures des pommes a réduit considérablement l’efficacité de la souche antagoniste Ach1-1 sans avoir un effet direct sur son développement. De plus, d’après l’analyse biochimique de la cinétique de l’épuisement des acides aminés des blessures des pommes, ces composés sont mieux métabolisés par la souche antagoniste que par le pathogène. Parmi ces acides aminés, la sérine et la glycine ont montré, dans plusieurs essais, un rôle important dans l’effet compétiteur de l’agent antagoniste. Toutefois, il se peut que d’autres composés des pommes soient également impliqués dans le mécanisme de compétition.

Dans l’ensemble, nos résultats apportent de fortes présomptions, à partir des essais *in vitro* et *in situ*, que la compétition pour les nutriments des pommes, et particulièrement pour les acides aminés, est l’un des principaux mécanismes impliqués dans l’activité de biocontrôle d’*A. pullulans* souche Ach1-1 vis à vis de *P. expansum* sur pomme en post-récolte. Parmi ces acides aminés, la sérine et la glycine sont les éléments les plus limitants dans cette compétition.

L’implication du mécanisme de la compétition pour la nutrition dans l’activité antagoniste de la souche Ach1-1 signifie que celle-ci exerce une activité fongistatique plus que fongicide vis-à-vis de *P. expansum* et stabilise son développement, puisqu’elle épouse les éléments nutritifs (limitants) qui sont présents dans les blessures et inhibe la germination des conidies du pathogène sans affecter leur viabilité. Ceci permet de retarder les infections de la pomme en post-récolte par le pathogène. Dans ce cas, la compétition pour la nutrition peut être efficace comme un mode d’action unique, ou en contribuant à affaiblir le pathogène et le prédisposer à d’autres modes d’actions qui demandent plus d’investigations.

CHAPITRE VI :
PERSPECTIVES

CHAPITRE VI : PERSPECTIVES

Le travail élaboré pourrait être poursuivi en réalisant une étude moléculaire sur l'expression des gènes spécifiques impliqués dans la voie métabolique d'un (ou des) élément(s) nutritif(s) les plus limitant(s) dans le mécanisme de la compétition pour la nutrition. Ceci peut être réalisé en comparant l'expression des gènes chez l'antagoniste *A. pullulans* souche Ach1-1 en présence ou en absence du pathogène *P. expansum* par l'utilisation de la technique de RT- PCR quantitative.

Des investigations pourront être également réalisées pour rechercher d'autres modes d'actions, comme la production des enzymes lytiques, qui peuvent contribuer simultanément ou séquentiellement avec la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 comme il a été rapporté pour d'autres souches d'*A. pullulans* (Ippolito et al., 2000 ; Castoria et al., 2001). Ainsi, il peut être envisagé de déterminer s'il y a des activités enzymatiques (?-1,3-glucanase, Chitinase, Peroxidase ou Nagase) dans les filtrats de cultures extraits des blessures des pommes inoculées avec l'agent antagoniste Ach1-1 et *P. expansum*, par l'utilisation des méthodes biochimiques. Dans le cas positif, il faudra purifier ces enzymes et les caractériser pour connaître la source de leur production (le fruit ou l'agent antagoniste) et quantifier l'importance de leur contribution dans l'activité de biocontrôle.

Par ailleurs, si un contrôle biologique est basé sur la compétition pour les éléments nutritifs, il peut être influencé par différents facteurs biotiques (l'espèce hôte, le profil nutritionnel) ou abiotique (la température, l'humidité relative) (Guetsky et al., 2002). Ainsi, il serait intéressant d'étudier la combinaison de cette souche avec des agents biologiques qui agissent par d'autres modes d'action ou avec d'autres méthodes de lutte afin d'améliorer l'activité de biocontrôle et élargir son spectre d'action en assurant un effet synergique ou additif.

En fin, la compréhension du rôle de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* permet de penser à une meilleure utilisation de cette souche dans la pratique. Ainsi il peut être recommandé de faire l'application de l'antagoniste sur les pommes juste après la récolte, pour lui permettre une colonisation efficace des sites blessés et renforcer son effet compétiteur avant l'introduction du pathogène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadias M. Teixid? N, Usall J. Vi?as I. and Magan N. 2001. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 123-129.
- Achbani E.H., Mounir R., El Jaafari S., Douira A., Benbouazza A. and Jijakli M.H. 2005. Selection of antagonists of postharvest apple parasites: *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Comm. App. Biol. Sci, Ghent University*, 70 (3), 5 143-149.
- Adikaram, N.K.B., Joyce, D.C., Terry, L.A. 2002. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. *Australian. Plant Pathol.* 31, 223–229
- Agrios G.N. 1978. Plant Pathology. Ed. Academic Press Inc., New York, San Fransisco, London, 319-324.
- Alvindia D. G, Natsuaki K. T. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*, 27(8), 1200-1207.
- AMPP. 2006. Index phytosanitaire Maroc. Association Marocaine de Protection des Plantes. Edition 2006.
- Arul J. 1994. Emerging technologies for the control of post-harvest diseases of fresh fruits and vegetables. In Wilson C.L and Wisniewski M.E., eds. *Biological Control of Post-harvest Diseases. Theory and Practice*. CRC Press, Florida, USA, p. 1-10.
- Attrassi K., Selmaoui K. , Ouazzani Touhami A., Badoc A. , Douira A. 2005. Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144, 47-62.
- Bachem C., Van der Hoeven R.S., de Brujin S.M. Vreugdenhil D., Zabeau M. and Visser R.G.F. 1996. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based in AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *The plant J.* 9, 745-753.
- Bachem C., Oomen R. Visser R. 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol. Bio. Reporter*. 16, 157-173.
- Bartnicki-Garcia S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Revue of Microbiology*. 22, 87-109.
- Batta Y.A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (3), 281-288.
- Bélanger R.R, Dufour N., Caron J, Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology*. 5, 41-53.
- Benhamou N. and Brondeur J. 2000. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. *Phytopathology*. 90 (9), 932-943.

- Bi Y., Tian S.P., Guo Y.R., Ge Y.H., Qin G.Z. 2006. Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons: induced resistance and fungistatic effects. *Plant Disease* 90, 279–283.
- Bio-protect, 2008. *Instructions for use BoniProtect® forte* [en ligne]. Disponible sur World Wide Web : <http://www.bio-protect.de/pdf/geb_boniforte_en.pdf>, Consulté le 25 septembre 2009
- Blakeman J.P. and Brodie I.D.S. 1977. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, 10, 29 – 42.
- Blakeman J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In Windels C.E., and Lindow S.E., eds. *Biological control on the phylloplane*. Macmillan Publishing Company, New York, Collier Macmillan Publisher, London, p. 385-413.
- Bolar J.P., Norelli J.L., Wong K.W., Hayes C.K., Harman G.E., Aldwinckle H.S. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to scab and reduces vigor, *Phytopathology*. 90, 72–77.
- Bollen A.F., Dela Rue B.T. 1999. Hydrodynamic heat transfer – a technique for disinfestations. *Postharvest Biology and Technology* 17, 133–141.
- Bompeix G., Cholodowski-Faivre D., Quennement J. 2000. Postharvest diseases of apples : Chemical and biological control, new data. *IOBC wprs Bulletin*, 23 (12), 147-151.
- Bonaterra A., Mari M., Casalini L., Montesinos E. 2003. Biological control of *Monilia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*. 84, 93-104.
- Bondoux P. 1992 (éd). *Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires*. INRA et PHM (revue horticole), Paris, France, 173p.
- Bull C. T., Wadsworth M. L., Sorensen K. N., Takemoto J. Y., Austin R .K .and Smilanick J. L. 1998. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biological Control*, 12, 89-95.
- Calvente V, Benuzzi D, De Tosseti MIS. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *Int. biodeterior. Biodegrade.* 43, 167-172.
- Calvo J., Calvente V., De Orellano M.E., Benuzzi D., De Tosseti M.I.S. 2003. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. *BioControl* 48 (5), 579-593.
- Calvo J., CalventeV., Orellano M.E., Benuzzi D., Tosseti M.I.S. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 251-257.
- Campbell R. 1989. Biocontrol of postharvest diseases – Introduction. In Fokkema N. J., K?lhl J. et Elad Y., eds. *Biological control of foliar and post-harvest diseases*. IOBC/WPRS Bulletin, 16, 93-94.
- Ca?am?s T.P., Vi?as I., Usall J., Casals C., Solsona C., Teixid? N. 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea*

- agglomerans* CPA-2: Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 86-95.
- Cao J., Zeng K., Jiang W. 2006. Enhancement of postharvest disease resistance in Ya Li pear (*Pyrus bretschneideri*) fruit by salicylic acid sprays on the trees during fruit growth. *European Journal of Plant Pathology* 114, 363–370.
- Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortes C., Guttierrez A., Chet I., and Herrera-Estrella A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech 42, in mycoparasitism. *Applied and environ. Microbio.* 65 (3), 929-935.
- Castoria R., De Curtis F., Lima G. and De Cicco V. 1997. β -1,3-Glucanase activity of two saprophytic yeast's and possible mode of action as biocontrol agents against post-harvest diseases. *Post-harvest Biol. Technol.*, 12, 293-300.
- Castoria R., De-curtis F., Limi G., Caputo L., Pacifico S., De-Cicco V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study of its mode of action. *Postharvest boil. technol.* 22(1), 7-17.
- Castoria R., Caputo L., De Curtis F., De Cicco V. 2003. Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A Possible New Mechanism of Action. *Phytopathology* 93 (5), 564-572.
- Chalutz E., Droby S., Wilson C.L. and Winsniewski M.E. 1992. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *Phytochem. Phytopbiol.B: Biol.* 15, 367 (Abstract).
- Chan Z., Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*, 36(2), 215-223.
- Chet, I., Benhamou, N., Haran, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. *Trichoderma and Gliocladium.* 2, 153-172.
- Choutka C. 1993. Etude d'adjuvants de formulation de deux levures antagonistes de *Botrytis Cinerea* et de *Penicillium* sp. sur pommes golden delicious en conservation. (Mémoire de fin d'étude). Gembloux, Faculté des Sciences Agronomiques
- Clarke F.E. 1965. The concept of competition in microbial ecology. In Barker K.F. et Snyder W.C., eds. *Ecology of Soil-born plant pathogens*. University of California Press, Berkeley, CA, 339-345.
- Communiqué de presse. 2003. *Service Public Fédérale Santé Publique, Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement. Retrait d'agrération de Du Pont Benlate* [en ligne]. Disponible sur World Wide Web :
<<http://www.fytoweb.fgov.be/FR/Pers/20030111%20Retrait%20d%27agr%C3%A9ation%20de%20Du%20Pont%20Benlate.htm>>, Consulté le 25 Septembre 2009.
- Communiqué de presse. 2007a. Service Public Fédérale Santé Publique, Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement. L'utilisation en plein air des produits phytopharmaceutiques à base de tolylfluanide a été retirée [en ligne]. Disponible sur World Wide Web :
<<http://www.fytoweb.fgov.be/FR/Pers/20070619%20retrait%20tolylfluanide.htm>>
Consulté le 25 Septembre 2009.
- Communiqué de presse. 2007b. Service Public Fédérale Santé Publique, Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement. Retrait de l'agrégation de certains usages du Captane [en

- ligne]. Disponible sur World Wide Web :
<<http://www.fytoweb.fgov.be/FR/Pers/20070509%20captane.html>> Consulté le 25 Septembre 2009
- Communiqué de presse. 2008. Service public federale sante publique, securite de la chaine alimentaire et environnement. Restriction d'usage de l'imazalil [en ligne]. Disponible sur World Wide Web :
<<http://www.fytoweb.fgov.be/FR/Pers/20080821%20restriction%20imazalil.htm>>
Consulté le 25 Septembre 2009
- Conway, W.S., Leverentz, B., Janisiewicz, W.J., Blodgett, A.B., Saftner, R.A., Camp, M.J., 2004. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biol. Technol.* 34, 11–20.
- Conway, W.S., Leverentz, B., Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Camp, M.J., 2005. Improving biocontrol using antagonist mixtures with heat and/or sodium bicarbonate to control postharvest decay of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 36, 235–244.
- Cook D. W. M., Long P. G., Ganesh S., and Cheah L.-H. 1997. Attachment microbes antagonistic against *Botrytis cinerea* - biological control and scanning electron microscope studies *in vivo*. *Ann. appl. Biol.* 131, 503-518.
- Costa E., Teixidó N., Usall J., Atarés E., Vinés I. 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 56, 367-371.
- Cotora M., Silva E. 2005. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia*, 97(2), 485-492.
- De Bondt A., Zaman S., Broekaert W., Cammue B., Keulemans J. 1999. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) for increased fungal resistance: in vitro antifungal activity in protein extracts of transgenic apple expressing *Rs-AFP2* or *ACE-AMP1*, *Acta Hort.* 484, 565–570.
- De Cal A., Pascual S., Melgarejo P. 1993. Nutritional requirements of antagonists to peach twig blight, *Monilinia laxa*, in relation to biocontrol. *Mycopathologia*. 121, 21-26.
- De Capdeville G., Wilson C.L., Beer S.V., Aist J.R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology*. 92, 900–908.
- De Clercq D., Cognet S., Pujol M., Lepoivre P., Jijakli M.H. 2003. Development of a SCAR marker and a semi-selective medium for specific quantification of *Pichia anomala* strain K on apple fruit surfaces. *Postharvest Biology and Technology*, 29(3), 237-247.
- DeEll, J.R., Murr D.P. 2003. *Directives et recommandations concernant l'entreposage des pommes en atmosphère contrôlée. Fiche technique*. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales. Ontario. Canada. en ligne]. Disponible sur World Wide Web : <<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/03-074.htm>> Consulté le 25 Septembre 2009.
- Deferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2576-2581.

- Dickburt C., Lepoivre P., and Jijakli M.H. 2001. ?-1,3-glucans and galacturonic acid enhanced the antagonistic activity of yeast against rots *Phytopathology*, S3 S23
- Dock L. L., Nielsen P. V. and Floros J. D. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* on apples stored under modified atmospheres. *J. Food Protec.*, 61, 1661-1665.
- Doss RP. 1999. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl Env Microbiol* 65, 404–408.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C. L. and Wisniewski M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.*, 35, 308-313.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C.L. 1991. Antagonistic microorganisms as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News Inf.*, 2, 169.
- Droby S., Robin D., Chalutz E. and Chet I. 1993. Possible role of glucanase and extracellular polymers in the mode of action of yeast antagonists of post-harvest diseases. *Phytoparasitica*, 21, 167.
- Droby S. and Chalutz E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. In Wilson C.L. and Wisniewski eds. *Biological Control of postharvest disease. Theory and practice*. CRC Press, Boca Raton. USA, 63-75
- Droby S., Cohen L., Danus A., Weiss B., Horev B., Katz H., Chalutz E. Keren-Tzur M, Shachnai A. 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*. 12, 97-101.
- Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* 92, 393–399.
- Droby S., Wisniewski M., El Ghaouth A., Wilson C. 2003a. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biol. and Technol.* 27, 127-135.
- Droby, S., Wsiniowski, M., El-Ghaouth, A., Wilson, C. 2003b. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: current achievements and future challenges. *Acta Horticulturae* 628, 703–713.
- Durifoy J.B. 2001. Etude d'agents stimulant l'activité antagoniste de deux souches de levures vis-à-vis des agents de pourritures de post-récolte (mémoire de fin d'étude). Gembloux, Faculté des Sciences Agronomiques.
- El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. 1995. Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and peach. *Plant Disease* 79 (3), 254-258.
- El Ghaouth A., Smilanick J.L., Wisniewski M. 2000. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose. *Plant disease*. 84 (3), 250-253.
- El Ghaouth A., Smilanick J.L, Brown G.E, Ippolito A. and Wilson C.L. 2001. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose. *Biological Control*. 20, 96-101.
- El Ghaouth A., Wilson C.L., and Wisniewski M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defence responses. *Phytopathology*. 93(3), 344-348.

- EL Guilli M. 2000. Développement de moyens de lutte biologique contre *Penicillium italicum* sur fruits d'agrumes en conservation (mémoire de DEA). Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 52p.
- Errampalli D., Northover J., Skog L., Brubacher N., Collucci C.A. 2005. Control of blue mold (*Penicillium expansum*) by fludioxonil in apples (cv Empire) under atmosphere and cold storage conditions. *Pest Management Science*. 61, 591 -596.
- Errampalli D., Nichole R., Brubacher. 2006. Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biological Control*. 36(1), 49-56.
- Faize M., Source S., Dupuis F., Parisi L., Gautier M.F., Chevreau E. 2004. Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus × domestica* Borkh.), *Plant Science*. 167(2) 347-354.
- Fallik E., Grinberg S. 1992. Hinokitiol: a natural substance that controls postharvest diseases in eggplant and pepper fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 2(2), 137-144.
- Ferrari A., Sicher C, Prodorutti D., Pertot I. 2007. Potential new applications of Shemer, a *Metschnikowia fructicola* based product, in post-harvest soft fruit rots control. *IOBC/ wprs Bulletin*, 30(6), 43-46.
- Fiddaman P.J., Rossall. S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*. 74 (2), 119-126.
- Filonow A.B., Vishniac H.S., Anderson J.A. and Janisiewicz W.J. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological control*, 7, 212-220.
- Filonow A.B. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of grey mold of apple. *Biocontrol Science and Technology* 8, 243-256.
- Fokkema N.J. 1991. The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: a plant pathologist's point of view. In Andrews J.H. et Hirano S.S., eds. *Microbial Ecology of leaves*. Ed Springer-Verlag, Madison USA, 3-18.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359.
- Friel D., Pessoa N.M.G., Vandenbol M., and Jijakli M. H. 2007. Separate and combined disruptions of two exo-?-1,3-Glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (Strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(4), 371–379.
- Fuleki T., Pelayo E., Palabay R.B. 1994. Sugar composition of varietals juices produced from fresh and stored apples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1266-1275.
- Gellatly, K. S., Ash, G. J., and Taylor, J. L. 2001. Development of a method for mRNA differential display in filamentous fungi: Comparison of mRNA differential display reverse transcription polymerase chain reaction and cDNA amplified fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Microbiol.* 47, 955-960.
- Gentile A., Deng Z., La Malfa S., Distefano G., Domina F., Vitale A., Polizzi G., Lorito M., Tribulato E. 2007. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. *Plant Breeding*. 126 (2), 146-151

- Giovanni A. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 8, 191- 198.
- Grevesse C. 2001. Study of the implication of exo- β -1,3 glucanase encoding genes in the biocontrol activity of *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman (strain K) against *Botrytis cinerea* Pers. on post-harvest apples (thèse de doctorat). Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, 161p.
- Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B.R., Nevalainen, H. 2005. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 47 (6), 381-388
- Guetsky R., Shitienberg D., Elad Y. Fischerr E., Dinoor A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*. 92 (9), 976-985.
- Guinebretiere M.H., Nguyen-the C., Morrison N., Reich M. and Nicot P. 2000. Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, 63(3), 386-394.
- Hammerschmidt R. and Kuc J. 1995. Induced resistance to disease in plants. Dordrecht: kluwer Academic Publishers.
- Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C. L. and Wisniewski M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defence responses. *Postharvest Biol. Technol.* 19, 265-272.
- Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 36(3), 245-252.
- Janisiewicz W. 1991. Post-harvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis.*, 75, 490-494.
- Janisiewicz W.J. and Marchi A. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease.*, 76, 555-560.
- Janisiewicz W.J., Usall J, Bors B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology*. 82 (11), 1364-1370.
- Janisiewicz W. and Bors R. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading post-harvest pathogens of fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3261-3267.
- Janisiewicz W.J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits – challenges and opportunities. In Boland J. and Kuykendall L.D., eds. *Plant-Microbe Integrations and Biological Control*, Marcel Dekker, New York, USA, p. 171-198.
- Janisiewicz, W. 1999. Blue mold. *Penicillium Spp.* Fruit Disease Focus [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web :
<http://www.caf.wvu.edu/Kearneysville/disease_month/bluemold0199.html> . Consulté le 25 Septembre 2009.

- Janisiewicz W.J., Tworkoski T.J., and Sharer C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90 (11), 1196-1200.
- Janisiewicz, W.J. & Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40, 411-441
- Janisiewicz, W.J., Leverentz, B., Conway, W.S., Saftner, R.A., Reed, A.N. & Camp, M.J. 2003. Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* 29, 129-143.
- Janisiewicz, W.J., Pereira, I.B., Almeida, M.S., Roberts, D.P., Wisniewski, M., Kurtenbach, E. 2008. Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia pastoris* recombinant strains expressing Psd1 antifungal peptide. *Postharvest Biology and Technology*. 47 (2), 218-225
- Jijakli M.H., Lepoivre P., Tossut P. and Thonart P. 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in postharvest apples by two antagonists yeasts. *Mec. Fac. Landbouw Univ.* 58/3b, 1349-1358.
- Jijakli, M.H., Lepoivre, P. 1993. Biological control of postharvest *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on apples. *IOBC/WPRS Bull.* 16, 106–110.
- Jijakli M.H. and Lepoivre P. 1995. Utilisation des biopesticides pour la protection des pommes en conservation. *Le fruit Belge*. 455, 83-88.
- Jijakli M.H. 1996. Etude des propriétés antagonistes de deux souches de levures vis-à-vis de *Botrytis cinerea* Pers. sur pomme en conservation (thèse de doctorat). Gembloux, Faculté Universitaire des sciences Agronomiques, 173 p.
- Jijakli M. H. and Lepoivre P. 1998. Characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, 88, 335-343.
- Jijakli M.H., Lepoivre P., Grevesse C. 1999. Yeast species for biocontrol of apple postharvest disease : an encouraging case of study for practical use. In: Mukerji K. G., Chamola B. P., and Upadhyay R.K., eds. *Biotechnological approaches in biocontrol of plant pathogens*. Klumer Academic / Plenum Publishers, New york, p. 31-49.
- Jijakli M.H., Grevesse C., Lepoivre P. 2001. Modes of action of biocontrol agents of postharvest diseases challenges and difficulties. Biological control of fungal and Bacterial Plant Pathogens. *IOBC wprs Bulletin*, 24(3), 317-318.
- Jijakli M.H., 2003. La lutte biologique en phytopathologie. In Lepoivre P., ed. *Phytopathologie*. De Boeck Université, Bruxelles, p. 289-317.
- Kang Y., Carlson R., Tharpe W., and Schell M. A. 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC 11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 3939-3947.
- Kloepper, J.W., Tuzun, S., Kuc, J.A. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 349-351.
- Kohl. J. et Fokhema. N.J. 1994. Fungal interactions on living and necrotic leaves In: Blakeman J.P and Williamson B. (eds). *Ecology of Plant Pathogens*. CABI. Oxon. England. 321-333.

- Kraus J., and Loper J.E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5'. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 849-854.
- Krimi Bencheqroun S., Bajji M., Massart S., Labhilili M., El Jaafari S. and Jijakli M.H.. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biol Technol.* 46, 128- 135.
- Kwon-Chung K.J. and Bennett J.E. 1992. Medical Mycology. Lea and Febiger, Philadelphia and London.
- Larkin R. P., Roberts D. P. and Gracia-garza J. A. 1998. Biological control of fungal disease. In: Hutson D. and Miyamoto J., eds. *Fungicidal Activity Chemical and biological approaches to plant protection*. John wiley & Sons Ltd, chichester New York, 149-178. .
- Larone D.H. 1995. Medically important fungi – A guide to identification, 3rd ed. ASM Press, Washignton, D.C
- Leibinger W., Breuker B. Hahn M. Mendgen K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87, 1103- 1110
- Lennox, C.L., Spotts, R.A., 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 87, 645–649.
- Leone G., Schoffelmeer A, van den Heuvel J. 1990. Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by *Botrytis cinerea*. *Can J Bot* 68:1921–1930
- Leverentz B., Conway W.S., Janisiewicz W.J., Saftner R.A., Camp M.J. 2003. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27(3) 221-233.
- Li H.X., Xiao C.L..2008. Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State *Postharvest Biology and Technology*, 47(2) 239-245.
- Lilly , V.G. and Barnett, H.L. 1951. Physiology of the fungi. McGraw-Hill Co., New York
- Lim, D., Hains, P., Walsh, B., Bergquist, P., and Nevalainen, H. 2001. Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach. *Proteomics*. 1, 899-909.
- Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. 1997a. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*. 10, 169-178.
- Lima G., De curtis F., Castoria R., De Cicco V. 1997b. Integrated control of postharvest diseases of « Annurca » apples by pre-storage application of yeasts and benomyl. In Bertolini P. Sijmons P.C. Guerzoni M.E., Serra F. (Eds.), *Non Conventional Methods for the control of postharvest diseases and microbiological spoilage*. Proceedings of the joint COST 914-915 workshop, 9-11 October 1997, Bologna, Italy, p. 121-126.
- Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., Arras, G. 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 223–229.

- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R., De Cicco, V. 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semicommercial conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 341–349.
- Lima, G., Spina, A.M., Castoria, R., De Curtis, F., De Cicco, V. 2005. Integration of biocontrol agents and food-grade additives for enhancing protection of stored apples from *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection* 68 (10), 2100-2106.
- Lima G., De Curtis F., Piedimonte D., Spina A.M., De Cicco V. 2006. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 40 (3), 301-307.
- Lorito M., Woo S.L. 1998. Advances in understanding the antifungal mechanism(s) of *Trichoderma* and new applications for biological control. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC Bulletin.*..21 (9), 73-80.
- Madrigal, C., Melgarejo, P. 1994. Mechanisms of action of the antibiotic flavipin on *Monilinia laxa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research* 98 (8), 874-878.
- MADRPM, 2000. Investir en Agriculture. Ministère de l’Agriculture et de la Pêche Maritime [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : <http://www.vulgarisation.net/invest_3.pdf> Consulté le 25 Septembre 2009.
- MADRPM, 2006. Données générales sur l’agriculture marocaine. Les cultures arboricoles. Direction de la Statistique. Ministère de l’Agriculture et de la Pêche Maritime Web : [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : <www.vulgarisation.net/arbo.html> Consulté le 25 Septembre 2009
- Manning M., Percy H. 1997 .Dry eye rot (*Botrytis cinerea*) in apples and pears. An Introduction to the Disease. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd
- Marcellin P. 1990. Maladies de conservation. *L’Arboriculture Fruitière*, 434, 61-68.
- Mari M., Guizzardi M., Brunelli M. and Folchi A. 1996. Post-harvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amylolique faciens*. *Crop Protection*, 15, 699-705.
- Mari M., Guizzardi M. 1998. The post-harvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*, 26, 59-66.
- Massart, S., Jijakli M.H. 2006. Identification of Differentially Expressed Genes by cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism in the Biocontrol Agent *Pichia anomala* (Strain Kh5). *Phytopathology*. 96(1), 80- 86.
- Massart, S., Jijakli M.H. 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *Journal of Microbiological Methods*. 69 (2), 229-241
- McCormack, P J 1 Wildman. H.G and Jeffries. P . 1993. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeast-like fungi. *Appl Environ Microbiol.* 60, 927-931.
- McLaughlin R.L., Wisniewski M.E., Wilson C.L., Chalutz E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apples with *Candida* sp. *Phytopathology*. 80, 456-461.

- Mercier J. and Wilson C. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control*, 4, 138-144.
- Mercier J. and Wilson C. L. 1995. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. *Post-harvest Biol. Technol.*, 6, 9-15.
- Meziane, H., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I., Chernin, L., Høfte, M., 2006. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 125–133.
- Mikani A., Etebarian H.R., Sholberg P.L., O'Gorman D.T., Stokes S., Alizadeh A. 2008. Biological control of apple grey mold caused by *Botrytis malii* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 107-112.
- Ministère de l'agriculture et de la pêche. 2008. Catalogue des usages actuels sur pommier. [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : <www.e-phphy.agriculture.gouv.fr/usa/12603212.html> Consulté le 25 Septembre 2009.
- Molloy C., Cheah L., Koolaard J. 2004. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan. *Postharvest Biology and Technology* 33, 61–65.
- Morales H., Sanchis V., Usall J., Ramos A.J., Mar?n S. 2008. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 61-67.
- Mounir, R., Durieux, A., Bodo, E., Allard, C., Simon, J.-P., Achbani, E.-H., El-Jaafari, S., Jijakli M.H. 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters* 29 (4), pp. 553-559
- Movahedi S, Heale J. 1990. The roles of aspartic proteinase and endopectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiol Mol Plant Pathol* 36, 303–324.
- Nair N.G., Guilbaud Oulton S., Barchia I., Emmett R. 1995. Significance of carry over inoculum, flower infection and latency on the incidence of *Botrytis cinerea* in berries of grapevines at harvest in New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35, 1177– 80.
- Nunes C., Usall J., Teixido N., Abadias M. and Vinas I. 2002. Improved control of postharvest decay of pears by the combination of *Candida sake* (CPA-1) and ammonium molybdate. *Phytopathology*. 92, (3), 281-287.
- Obagwu J., Korsten L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), 187-194.
- Oukabli A.- Le pommier. 2004. Une culture de terroir en zones d'altitude. - *Transfert de Technologie en Agriculture, Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA*, 115, 4 p. [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : <<http://www.vulgarisation.net/115.pdf>> consulté 25 Septembre 2009.
- Porat R., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., Droby S. 2003. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by ?-aminobutyric acid. *European Journal of Plant Pathology* 109, 901–907.

- Punja, Z., Utkhede, R., 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* 21, 400–407.
- Pusey P.L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. In Wilson C.L. and Wisniewski M.E. eds. *Biological control of postharvest diseases. Theory and practice.* CRC Press, Boca Raton, WV, USA. p77-88.
- Ragazzi A and Turco E. 1997. Antagonist effects of some fungi of Banana fruit against *Collototrichum musae*. *J. Plant Disease Protection*, 104-3, 281-288.
- Rha E, Park H, Kim M, Chung Y, Lee CW, Kim J. 2001. Expression of exopolygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett* 120, 105–109.
- Rosenberger D.A. 1991. Post-harvest diseases (Blue mold- Gray mold). In Jones A.L., Aldwinckle H.S., eds. *Compendium of apple and pear diseases.* APS Press The American Phytopathological Society, USA, p 53-58.
- Roussel M., Lemarchand M., Benard M., Dreyfus J. 2007. La patuline. Fiche technique du service régional de la protection des végétaux de Haute-Normandie.
- Saligkarias I.D., Gravanis F. T., Epton H. A. S. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. *Biological Control*, 25(2) 143-150.
- Sanderson P.G. 2000. Management of decay around the word and at home. 16th Annual Postharvest Conference, Yakima, WA March 14-15, 2000 [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : <<http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pgDisplay.php?article=PC2000Z>>. Consulté.
- Sansone G., Rezza I., Calvente V., Benuzzi D., Tosetti M.I.S. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology*, 35(3), 245-251.
- Saravananakumar D., Ciavarella A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L. 2008. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 121-128.
- Schena L., Nigro F., Pentimone I., Ligorio A. et Ippolito A. 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans* *Postharvest Biology and Technology*. 30 (3), 209-220
- Sholberg, P.L., Conway, W.S., 2004. Postharvest Pathology. In Gross, K.C., Wang, C.Y., Saltveit, M., (Eds). Agriculture Handbook Number 66: The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : <<http://usna.usda.gov/hb66/contents.html>> Consulté le 25 Septembre 2009.
- Sommer N.F. 1982. Post-harvest handling practices and post-harvest diseases of fruit. *Plant Diseases*, 66, 357-364.
- Spadaro D., Piano S., Duverney C. and Gullino M.L. 2002. Use of microorganisms, heat treatment, and natural compounds against Botrytis rot on apple. In: *Proc. 2nd International Conference on the Alternative Control Methods Against Plant Pests and Diseases, Lille, France, 4-7 March 2002*, Ed. AEPP, Paris, France , 446-453.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., 2003. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 185–194.

- Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L. 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2) 141-151.
- Spadaro D., Sabetta W., Acquadro A., Portis E., Garibaldi A., Gullino M.L. 2008. Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. *Microbiological Research*. 163 (5), 523-530.
- Spotts R.A., Cervantes L.A. 1986. Population, pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouse. *Plant Disease*, 70: 106–108.
- Spotts R.A., Serdani M., Mielke E.A., Bai J., Chen P.M., Hansen J.D., Neven L.G., Sanderson P.G. 2006. Effect of high-pressure hot water washing treatment on fruit quality, insects, and disease in apples and pears: Part II. Effect on postharvest decay of d'Anjou pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 40 (3), 216-220.
- Stehmann C., De Ward M.A. 1996. Sensitivity of population of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. *European Journal of Plant Pathology*. 102, 171–180.
- St-Germain G. et Summerbell R. 1996. Identifying filamentous fungi – A clinical laboratory handbook, 1st ed. Star Publishing company, Belmont, California
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., , traux, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35, 235-270.
- Teixidó N., Vinóls I., Usall J., Sanchis V., Magan N. 1998a. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 to water temperature and pH stress. *Journal Appl. Microbiol.* 84, 192-200.
- Teixidó N., Vinóls I., Usall J., Magan N. 1998b. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88 (9), 960-964.
- Terry L.A., Joyce D.C., 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 1–13.
- Tian S.P., Yao H.J., Deng X., Xu X.B., Qin G.Z., Chan Z.L. 2007. Characterization and expression of ?-1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *Biol. Control* 97, 260–268.
- Tronsmo A. and Raa J. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* 89, 216-220.
- Usall, J., , all , N., , aas, I., Smilanick, J.L. 2001. Biological control of *Penicillium digitatum* on citrus fruits with the antagonistic bacterium *Pantoea agglomerans*. *Acta Hort* 553, 377-381.
- USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001. Apples, raw, with skin [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/measure.pl>> Consulté le 25 Septembre 2009.
- Verhoeff K. 1980. The infection process and host-pathogen interactions. In Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R., eds. *The biology of Botrytis*. Academic Press Inc., London, U.K., 153-180.
- Vero S., and Mondino P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticul. Inter.*26.

- Vero S., Mondino P., Burgueno J., Soubes M., Wisniewski M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 26, 91-98.
- Vinas I., Usall J., Teixido N. and Sanchis V. 1998. Biological control of major post-harvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiology*, 40, 9-16.
- Vincent M. N., Harrison L. A., Brackin J.M., Kovacevich P. A., Mukerji P., Wellet D. M. and Pierson E. A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2928-2934.
- Vostermans B., Creemers P., Bylemans D., Garnier A., 2005. A new postharvest fungicide to control fruit rot on apple and pear. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70, 79–89.
- Viterbo, A., Harel, M., and Chet, I. 2004. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:151-158.
- Walters D., Walsh D., Newton A., Lyon G. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95, 1368–1373.
- Weiss, A., M?gel, G. and Kunz, S. 2006. Development of “Boni-Protect” – a yeast preparation for use in the control of postharvest diseases of apples.” 12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, Weinsberg, F?rdergemeinschaft ?kologischer Obstbaue.V., 113-117
- William S.C., Janisiewicz, W. J. Leverentz B., Saftner R. A. and Camp. M. J. 2007. Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture, and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*. 4(3), 326-332.
- Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hortic.* 40, 105-112.
- Wilson C.L. and Wisniewski M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review Phytopathology*, 27, 425-441.
- Wilson C.L., El Ghaouth A., Chalutz E., Droby S., Stevens C., Lu J.Y., Khan V., Arul J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease*. 78, 837-844.
- Wilson C.L., Solar J.M., El Ghaouth A., Wisniewski M.E. 1997. Rapid evaluation of plants extracts and essential oils for antifungal activity against *B. cinerea*. *Plant Dis.*, 81, 204-210.
- Wisniewski M., Billes C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C. and Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*.I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular plant Pathology*. 39, 245-258.
- Wisniewski M., Wilson C.L. and Hershberger W. 1989. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacea*. *Can. J. Bot.* 67, 2317-2323.
- Wisniewski M., Droby S., Chalutz E., Eilam Y. 1995. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology*. 44, 1016-1024.

- Wisniewski, M.E., Bassett, C.L., Artlip, T.S., Janisiewicz, W.J., Norelli, J.L., Droby, S., 2005. Overexpression of a peach defending gene can enhance the activity of post harvest biocontrol agents. *Acta Horti.* 682, 1999–2006.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96 (2), pp. 181-185.
- Wong K.W., Harman G.E., Norelli J.L., Gustafson H.L., Aldwinckle H.S. 1999. Chitinase-transgenic lines of “Royal Gala” apple showing enhanced resistance to apple scab, *Acta Hort.* 489, 595–599.
- Xiao C.L. Boal R.J. 2009. Preharvest application of a Boscalid and Pyraclostrobin Mixture to control postharvest gray mold and blue mold in apples. *Plant disease.* 93 (2). 185-189.
- Yao, H.J., Tian, S.P., 2005. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *J. Appl. Microbiol.* 98, 941–950.
- Yu T., Chen J., Chen R., Huang B., Liu D., Zheng X. 2007. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3), 339-345.
- Yu T., Wang L., Yin Y., Wang Y. and Zheng X. 2008. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 29, 44-48.
- Zhang H., Wang L., Dong Y., Jiang S., Cao J., Meng R. 2007a. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control*, 40 (2), 287-292.
- Zhang H., Zheng X., Wang L., Li S., Liu R. 2007b. Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries (b). *Journal of Food Engineering*, 78(1) 281-287.
- Zhao Y., Tu K., Shao X., Jing W., Su Z. 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 113-120.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1:

Echelle de germination des conidies de *P. expansum* après 24h d'incubation dans des milieux de jus de pommes à différentes concentrations en présence ou en absence des souches antagonistes *P. anomala* (souche K) et de *A. pullulans* (1113-5, 1112-3 et Ach1-1).

Traitements (antagoniste + % jus)		Echelle de germination ^(a)			Germination des conidies (%) ^(b)	Taux de réduction de germination/témoins ^(c)
		classe 1	classe 2	classe 3		
Témoin	0	81	19	0	19 +/-0	-
	0,1	18	77	5	82+/-4	-
	0,5	1	0	99	99+/-1	-
	1	9	5	86	91+/-4	-
	5	6	0	94	94+/-3	-
Souche K	0	73	23	4	27+/-1	-
	0,1	82	16	2	18+/-2	64
	0,5	76	17	7	24+/-5	75
	1	68	11	21	32+/-1	59
	5	38	22	40	62+/-3	32
1113-5	0	74	16	10	26+/-2	-
	0,1	91	6	3	9+/-1	73
	0,5	77	3	20	23+/-5	76
	1	74	3	23	26+/-3	65
	5	19	25	56	81+/-2	13
1112-3	0	64	8	28	36+/-3	-
	0,1	53	9	38	47+/-6	35
	0,5	38	7	55	62+/-7	37
	1	27	5	68	73+/-4	18
	5	34	3	63	66+/-4	28
Ach1-1	0	80	2	18	20+/-1	-
	0,1	70	2	28	30+/-2	52
	0,5	71	6	23	29+/-5	70
	1	49	3	48	51+/-4	40
	5	4	9	87	96+/-3	0

(a): Echelle de germination: 1= pas de germination; 2= tube germinatif <4x taille de la conidie;

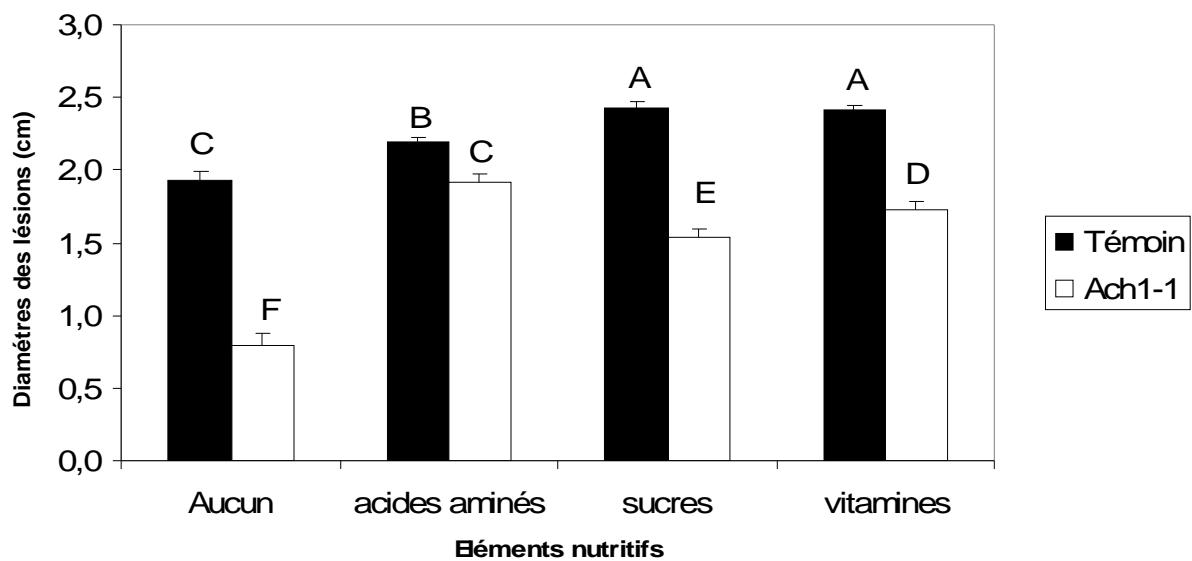
3= tube germinatif > 4x taille de la conidie ; 100 conidies sont comptées par traitement

(b): Le taux de germination total (classe2+classe3) plus ou moins l'écart type.

(c): Le taux de réduction de la germination par rapport aux témoins

Annexe 2 :

Effet de l'application exogène des sucres, des vitamines ou des acides aminés dans les blessures des pommes sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum* en absence (témoin) ou en présence d'*A. pullulans* (Ach1-1) après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée à partir de 45 répétitions. Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ($P \geq 0,05$) (Deuxième répétition dans le temps)

Annexe 3 :

Analyse de la variance de l'effet de l'application des sucres, des vitamines ou des acides aminés dans les blessures des pommes (traitement) sur le diamètre des lésions causées par *P. expansum* en absence ou en présence d'*A. pullulans* souche Ach1-1 pour deux répétitions réalisées dans le temps

Source de la variation	DL	SCE	CM	Fob	Probabilité
Traitement	7	310,67	44,38	983,69	<0,0001**
Répétition	1	7,78	7,78	169,01	<0,0001**

DL: degré de liberté; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : Carré moyen ; Fob : F observé ;

** différence significative à $p=0,05\%$

Annexe 4 :

Concentration (nmol/ml) des différents acides aminés présents dans les blessures des pommes durant les premières 24 h d'incubation (0, 6, 14 et 24H). Les blessures étaient intactes (Aucun), ou traitées avec la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* (Antag.), ou inoculées avec *P. expansum* seul (Pathog.) ou traitées avec la souche Ach1-1 et ensuite inoculées avec *P. expansum* (A + P). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque traitement.

	sérine	ac.glutamique	glycine	ac.aspartique	histidine	arginine	thréonine	alanine	proline	tyrosine	valine	méthionine	lysine	leucine	tryptophane	phénylalanine	Somme ^a
Aucun 0H	13,5	112	32,5	2	2,5	6	6,5	60	80,5	0	1,5	0	0,5	3	1	0,5	322
Aucun 6H	12,5	42	21	3,5	2	10	5,5	52,5	64,5	0	1	0	1	1	1	0	217,5
Aucun 14h	7,5	15,5	11	2	1	7	4,5	28	36	0	1	0	0	0	0	0	113,5
Aucun 24H	1	2,5	1,5	1	1	3,5	4	21,5	27	0	0	0,5	0	0	0	0	63,5
Antag 6H	3	0	3	4	1,5	8	5,5	48,5	107,5	0	1	0	0,5	0	0	0	182,5
Antag 14h	0	1	0	1,5	1	5	3	27,5	28	0	0,5	0	0	0	0	0	67,5
Antag 24H	0,5	2	0	1	0,5	3	0	13,5	30	0	0	0	0	0	0	0	50,5
Pathog 6H	13	76	20	3,5	2	8	4,5	47	46,5	0	1	0	0	1	0,5	0	223
Pathog 14h	14	12	5	0,5	1,5	5,5	3,5	33,5	39	0	1	0	0	0	0,5	0	116
Pathog 24H	5,5	2	2	1	1	3	2	21	36,5	0	0,5	0	0	0,5	0,5	0	75,5
A+P 6H	1	2	1	3	1	7	4	35	42	0	1	0	0	0	0	0	97
A+P 14h	0,5	2,5	0	1	1,5	5	3	20	27	0	0,5	0	0	0	0,5	0	61,5
A+P 24H	0,5	2	0	1	0,5	4	2,5	19,5	25	0	0,5	0	0	0,5	0	0	56

(a) : Somme des concentrations de l'ensemble des acides aminés correspondant à chaque traitement pendant un temps de prélèvement

- Groupe 1 : acides aminés dont les concentrations ont largement diminué avec le temps de l'incubation.
- Groupe 2 : acides aminés dont les concentrations restaient presque inchangées durant l'incubation
- Groupe 3 : acides aminés qui existent en très faibles concentrations

Annexe 5 :

Résultat du test d'efficacité de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* qui a été réalisé en parallèle avec l'analyse par HPLC de la cinétique des acides aminés dans les blessures. Les barres verticales représentent l'E.S. (n=45).

