

**Table des matières**

**Partie 1: Introduction** \_\_\_\_\_ **1**

**Partie 2: Synthèse bibliographique**

**Chapitre 1 : La Guadeloupe** \_\_\_\_\_ **2**

1.1. **Situation géographique** \_\_\_\_\_ **2**

1.2. **Climat** \_\_\_\_\_ **2**

**Chapitre 2 : Le bananier** \_\_\_\_\_ **3**

2.1. **Taxonomie** \_\_\_\_\_ **3**

2.2. **Aspect botanique** \_\_\_\_\_ **4**

2.3. **L'inflorescence** \_\_\_\_\_ **4**

**Chapitre 3 : La culture de la banane en Guadeloupe** \_\_\_\_\_ **5**

3.1. **Historique** \_\_\_\_\_ **5**

3.2. **Itinéraire technique et soins aux bananiers dans les Antilles françaises** \_\_\_\_\_ **6**

3.2.1. De la plantation à la récolte \_\_\_\_\_ **6**

3.2.2. La récolte \_\_\_\_\_ **7**

3.2.3. Les opérations à la station d'emballage \_\_\_\_\_ **8**

3.2.4. Le transport des fruits et leur mise sur le marché \_\_\_\_\_ **9**

**Chapitre 4 : La maladie de la pourriture de couronne** \_\_\_\_\_ **10**

4.1. **Introduction** \_\_\_\_\_ **10**

4.2. **Origine** \_\_\_\_\_ **10**

4.3. **Symptômes** \_\_\_\_\_ **11**

4.4. **Agents pathogènes** \_\_\_\_\_ **11**

4.1.1. *Colletotrichum musae* (Berk. And Curt.) \_\_\_\_\_ **12**

4.1.2. *Fusarium moniliforme* J. Sheld. \_\_\_\_\_ **13**

---

4.1.3.	<i>Cephalosporium sp.</i>	13
<b>4.5.</b>	<b>Cycle infectieux</b>	<b>14</b>
<b>4.6.</b>	<b>Contrôle de la maladie</b>	<b>15</b>
4.6.1.	Méthode culturale	15
4.6.2.	La manipulation des fruits et les traitements au hangar d'emballage	16
4.6.3.	Lutte chimique	17
4.6.4.	Lutte physique	18
4.6.5.	Lutte biologique	20
<b>Chapitre 5 :</b>	<b>La lutte biologique</b>	<b>22</b>
<b>5.1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>22</b>
<b>5.2.</b>	<b>Définition de la lutte biologique</b>	<b>22</b>
<b>5.3.</b>	<b>La lutte biologique dans le domaine du post-récolte</b>	<b>23</b>
5.3.1.	Introduction	23
5.3.2.	Avantage du post-récolte pour un traitement avec des agents biologiques	23
<b>5.4.</b>	<b>Applications aux champs ou après la récolte pour contrôler les maladies de post-récolte</b>	<b>23</b>
<b>5.5.</b>	<b>Etapes du développement de la lutte biologique</b>	<b>24</b>
5.5.1.	Isolement et sélection des agents antagonistes	24
5.5.2.	Production en masse et formulation	25
5.5.3.	Etude des modes d'actions	25
5.5.4.	Traçage et écologie des agents de lutte biologique	28
5.5.5.	Application pratique	28
5.5.6.	Amélioration du système de biocontrôle	28
<b>Chapitre 6 :</b>	<b>Les levures</b>	<b>29</b>
<b>6.1.</b>	<b>Classification et caractéristiques générales</b>	<b>29</b>
<b>6.2.</b>	<b>Sélection de deux levures : <i>Pichia anomala</i> souche K et <i>Candida oleophila</i> souche O</b>	<b>29</b>
6.2.1.	Généralités	29
6.2.2.	<i>Candida oléophila</i> souche O	30
6.2.3.	<i>Pichia anomala</i> souche K	30
6.2.4.	Mode d'action	30
<b>Chapitre 7 :</b>	<b>Contexte économique de la banane guadeloupéenne</b>	<b>32</b>

---

<b><u>Partie 3: Objectifs</u></b>	<b>34</b>
<b><u>Partie 4: Matériels et méthodes</u></b>	
<b>Chapitre 1 : Choix des espèces fongiques étudiées</b>	<b>35</b>
<b>Chapitre 2 : Souches de levures utilisées</b>	<b>35</b>
<b>Chapitre 3 : Matériel végétal et échantillonnage</b>	<b>35</b>
<b>Chapitre 4 : Nature des objets témoins</b>	<b>36</b>
<b>Chapitre 5 : Méthode de reproduction des symptômes</b>	<b>37</b>
5.1. Préparation des pathogènes	37
5.2. Préparation des couronnes	37
5.3. Inoculation des couronnes	38
5.4. Simulation du programme d'exportation	38
5.5. Evaluation de la progression des pathogènes	38
<b>Chapitre 6 : Préparation et application des suspensions de levures</b>	<b>40</b>
6.1. Préparation des suspensions de levures	40
6.2. Application des levures sur les couronnes	41
<b>Chapitre 7 : Essais réalisés</b>	<b>41</b>
7.1. Evaluation de l'efficacité de deux souches de levures vis-à-vis de trois agents fongiques impliqués dans la maladie	41
7.2. Evaluation de l'efficacité de la souche O vis-à-vis des pourritures de couronne en fonction du temps séparant l'application de la levure de celle du complexe	42
7.3. Evaluation de l'efficacité de la souche O en combinaison avec l'utilisation de polybags de 50 µm vis-à-vis des pourritures de couronnes	42

---

<b>Chapitre 8 : Méthode d'analyse</b>	<b>44</b>
<b>8.1. Conditions d'application</b>	<b>44</b>
<b>8.2. Type d'analyses</b>	<b>44</b>
<b>8.3. Remarque relative à l'analyse des données concernant les traitements fongicides</b>	<b>44</b>
<b>8.4. Logiciels utilisés</b>	<b>44</b>

**Partie 5: Résultats et discussions**

<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>45</b>
----------------------------------	-----------

<b>Chapitre 2 : Evaluation de l'efficacité de deux souches de levures vis-à-vis de trois agents fongiques impliqués dans la maladie</b>	<b>46</b>
---	-----------

<b>2.1. Généralités</b>	<b>46</b>
<b>2.2. Bouquets inoculés avec <i>Colletotrichum musae</i></b>	<b>46</b>
2.2.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)	46
2.2.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)	47
2.2.3. Discussion	48
<b>2.3. Bouquets inoculés avec <i>Fusarium moniliforme</i></b>	<b>50</b>
2.3.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)	50
2.3.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)	51
2.3.3. Discussion	52
<b>2.4. Bouquets inoculés avec <i>Cephalosporium sp.</i></b>	<b>54</b>
2.4.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)	54
2.4.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)	55
2.4.3. Discussion	55
<b>2.5. Bouquets inoculés avec le complexe</b>	<b>57</b>
2.5.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)	57
2.5.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)	58
2.5.3. Discussion	59
<b>2.6. Discussion générale de l'essai</b>	<b>60</b>

---

<b>Chapitre 3 : Evaluation de l'efficacité de la souche O des pourritures de la couronne en fonction du temps séparant l'application de la levure de celle du complexe</b>	<b>62</b>
3.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)	62
3.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)	63
3.3. Discussion	64
<b>Chapitre 4 : Evaluation de l'efficacité de la souche O à 10<sup>8</sup> ufc/ml en combinaison avec l'utilisation de polybags de 50 µm vis-à-vis des pourritures de couronne</b>	<b>67</b>
4.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)	67
4.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)	68
4.3. Discussion	69
<b><u>Partie 6: Conclusions et perspectives</u></b>	<b>76</b>

---

## **Introduction**

Le terme « banane » englobe tous les différents types de « bananes dessert » et de « bananes à cuire » rencontrés dans le monde, y compris les « bananes plantains ». La plante est cultivée dans plus de 120 pays sur près de 10 millions d'hectares, avec une production annuelle de 95 millions de tonnes. Les bananes occupent la quatrième place parmi les plantes alimentaires cultivées dans le monde après le riz, le blé et le maïs. Près de 90% de la production sont issus de petits agriculteurs, produisant pour la consommation domestique et les marchés locaux.

En Occident, la « banane dessert » d'exportation est la plus connue alors qu'elle ne représente que 10% de la production mondiale. Ces trente dernières années, la production mondiale de « bananes dessert » a plus que doublé et les exportations ont triplé de volume. La banane d'exportation représente un pivot pour l'économie de nombreux pays des Caraïbes. L'activité bananière procure aux Antilles françaises 2000 emplois directs et indirects. Elle constitue, avec la production de canne à sucre, la base de l'économie agricole de la Martinique et de la Guadeloupe.

Depuis des années, les Européens et les Américains se livrent une guerre autour de la banane. Les bananes européennes et celles des pays ACP, plus chères, bénéficient d'importantes aides de l'Union Européenne. En effet, elles sont produites avec des coûts de main-d'œuvre bien plus élevés que les bananes sud-américaines et dans des conditions climatiques moins favorables. Ce système d'aides est jugé discriminatoire et non conforme aux règles du commerce international mis en place par l'OMC. Ainsi, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2006, la protection communautaire et celle des pays ACP seront diminuées. A partir de cette date, la concurrence avec les « bananes dollars » risque donc de s'accroître.

De plus, la qualité de la banane antillaise souffre d'une mauvaise réputation. En effet, les accidents de maturation et les maladies de conservation telles les pourritures de couronne en diminuent la qualité. Les pourritures de couronne sont considérées comme la maladie de conservation la plus importante. Elles sont causées par un complexe parasitaire dont le champignon principal est *Colletotrichum musae* (Berk. and Curt. Arx.). Pour lutter contre ce complexe parasitaire, la méthode utilisée actuellement est le traitement fongicide. Cependant, la lutte chimique pose certains problèmes. L'apparition de phénomènes de résistance aux fongicides a été observée. Les traitements ne sont pas toujours efficaces et les consommateurs demandent une diminution de ceux-ci, particulièrement en post-récolte.

Dans l'optique d'une diminution des traitements fongicides, la lutte biologique pourrait trouver sa place. D'autant plus que les recherches menées par le CIRAD-FLHOR de Neufchâteau

---

(Guadeloupe) visent la création d'un label « sans traitement fongicide après récolte » afin de conserver une certaine compétitivité sur le marché de la banane.

Les deux souches de levures isolées par l'Unité de Phytopathologie de Gembloux ayant déjà fait la preuve de leur efficacité contre certains pathogènes de blessures des pommes en conservation, il est intéressant d'évaluer leurs effets antagonistes sur la maladie de la couronne qui infecte les bananes principalement via les blessures de découpe.

C'est dans ce cadre de recherche que s'inscrit ce travail effectué en collaboration avec le CIRAD-FLHOR de Guadeloupe et l'Unité de Phytopathologie de la FUSAGx.

## Chapitre 1 : La Guadeloupe

### 1.1. Situation géographique

( Atlas des Départements français d'outre-mer, 1982)

La Guadeloupe est un archipel situé au milieu de l'arc des Petites Antilles, par 61° de longitude ouest et 16° de latitude nord, entre l'Atlantique tropical et la mer des Caraïbes (Fig. 1). Sa superficie est de 1780 km<sup>2</sup>. Découverte par Christophe Colomb en 1493, la Guadeloupe était à l'origine peuplée par des populations amérindiennes. Devenue colonie française en 1635, elle forme, depuis 1946, un département français d'outre-mer comme la Martinique, la Guyane et la Réunion.

### 1.2. Climat

( Atlas des Départements français d'outre-mer, 1982)

L'île est balayée par des courants marins et atmosphériques dirigés d'est en ouest qui véhiculent des eaux chaudes en provenance de la zone équatoriale. Les courants atmosphériques sont constitués de flux d'alizés qui soufflent des hautes pressions subtropicales (anticyclone des Açores) vers les zones dépressionnaires équatoriales. Les masses d'air transportées par ces courants libèrent des précipitations importantes lorsqu'elles s'élèvent et se refroidissent en arrivant au contact du versant oriental de la Basse-Terre. La ligne de crête franchie, les masses d'air asséchées redescendent sur le versant ouest en se réchauffant (Fig. 2).

La carte des isohyètes moyennes annuelles illustre parfaitement ce phénomène : la pluviométrie augmente avec l'altitude et, à altitude égale, le versant exposé au vent est plus arrosé que le versant sous le vent (Fig. 3).

Les températures sont régies par le même mécanisme. La carte des isothermes moyennes annuelles montre en effet que les températures décroissent régulièrement avec l'altitude, mais qu'à altitude égale, le versant sous le vent bénéficie de températures plus élevées (Fig.4).

Le climat guadeloupéen présente des variations saisonnières : une période plus sèche et plus fraîche (période dite du Carême) se situe entre janvier et avril. De juillet à novembre, une période chaude et humide (ou hivernage) correspond à la saison cyclonique.

A la station du CIRAD-FLOHR de Neufchâteau, la température moyenne annuelle est de 23,7°C. L'humidité moyenne est supérieure à 75%, maximale pendant l'hivernage et minimale au « carême » (Pineros et Juan, 1994). L'insolation est très variable selon les années et avoisine les 2200

heures par an. La pluviométrie moyenne est fortement influencée par la dorsale volcanique et atteint 3800 mm (Pineros et Juan, 1994).

Le climat guadeloupéen est donc caractéristique du domaine tropical maritime chaud et humide, mais tempéré et uniformisé par le régime des alizés.

## Chapitre 2 : Le bananier

### 2.1. Taxonomie

(Bakry *et al.*, 1997)

Les bananiers sont souvent différenciés en fonction de la qualité de leurs fruits et sont dits de type « dessert » pour les variétés riches en sucre ou « à cuire » pour les variétés riches en amidon. Les bananiers de type dessert sont des monocotylédones classées de la manière suivante :

- Ordre : Zingibérales
- Famille : *Musaceae*
- Genre : *Musa*

Le genre *Musa* est divisé en 4 sections : *Australimusa* ( $2n=2x=20$ ), *Callimusa* ( $2n=2x=20$ ), *Rhodochlamys* ( $2n=2x=22$ ) et *Eumusa* ( $2n=2x=22$ ) qui regroupe à lui seul presque tous les bananiers cultivés.

Les bananes comestibles sont principalement issues de deux espèces sauvages diploïdes :

- *Musa acuminata* Colla
- *Musa balbisiana* Colla

Leurs génomes sont respectivement notés A et B depuis que Simmonds et Shepherd ont proposé cette représentation en 1955.

Ces deux espèces se reproduisent par voie sexuée et par multiplication végétative à partir des rejets provenant du développement des bourgeons axillaires de la tige souterraine.

Leur évolution et leur domestication par l'homme ont permis l'obtention des variétés actuelles qui sont généralement des clones triploïdes, stériles et parthénocarpiques. Elles sont issues soit de la seule espèce *M. acuminata* (AAA), soit de croisements interspécifiques entre *M. acuminata* et *M. balbusiana* (groupes AAB et ABB) (Fig. 5).

Les variétés diploïdes (AA) et (AB) ainsi que les clones tétraploïdes interspécifiques sont plus rares.

On retrouve des types « dessert » parmi tous les grands groupes de bananiers, mais ceux qui sont utilisés pour la culture d'exportation comme la Grande-Naine, la Poyo et la Williams sont principalement des triploïdes de l'espèce *M. acuminata* AAA appartenant au sous-groupe des « Cavendish ». La variété Gros-Michel appartient également au groupe des triploïdes AAA.

## **2.2. Aspect botanique**

Le bananier est une herbe géante dont le pseudo-tronc, formé par l'emboîtement des gaines foliaires, mesure de 1 à 8 mètres (Champion, 1963) (Fig.6).

Les feuilles sont émises par le méristème terminal de la tige vraie souterraine improprement appelée « bulbe ». Les nouvelles feuilles se déroulent au sommet du pseudo-tronc et sont donc de plus en plus jeunes en se rapprochant du sommet. Par convention, elles sont numérotées de la plus jeune à la plus âgée (Bakry *et al.*, 1997). Le nombre de feuilles varie selon le cultivar et les conditions environnementales (Jones, 1999).

Les feuilles, dont la durée de vie varie entre 70 et 200 jours, présentent une surface pouvant aller jusqu'à 2 m<sup>2</sup> fournissant ainsi à la plante une surface foliaire importante au moment de la floraison et permettant de canaliser les eaux de pluie (Stover et Simmonds, 1987).

Le bourgeon situé à l'aisselle de chaque feuille donne éventuellement naissance à un rejet. A la fin de la phase végétative, le changement de fonctionnement du méristème central provoque la croissance et l'allongement de la tige vraie au cœur du pseudo-tronc puis l'émergence de l'inflorescence (Bakry *et al.*, 1997).

## **2.3. L'inflorescence**

(Bakry *et al.*, 1997)

Dans le cas des variétés Cavendish comme la Grande-Naine, la floraison intervient dès qu'une trentaine de feuilles ont été émises.

L'inflorescence du bananier, appelée régime, se caractérise par un pédoncule robuste d'environ 1m de long recourbé vers le bas. Elle est constituée de spathes pourpres, déhiscentes, imbriquées, disposées en hélice qui se soulèvent avant de tomber rapidement et à l'aisselle desquelles naissent les

rangées simples ou doubles de fleurs (Fig.8). Ce sont les premières rangées de fleurs, appelées mains, qui forment les régimes de fruits. Ces premières rangées sont constituées de fleurs femelles avec un ovaire infère comprenant trois loges carpellaires à l'intérieur desquelles deux rangées d'ovules sont insérées sur un placenta axilaire et des étamines non fonctionnelles. Les ovaires se remplissent de pulpe pour former le fruit sans pollinisation ni formation de graines. Cependant, les fruits de certains clones cultivés produisent des graines lorsqu'ils sont pollinisés.

Les mains sont composées de 10 à 30 fleurs ou doigts insérés sur le coussinet et sont numérotées à partir de la première main dégagée. A l'anthèse, les doigts sont dirigés vers le bas et se redressent progressivement pour atteindre, en plus ou moins 15 jours, le stade appelé « stade doigts horizontaux ».

Après les fleurs femelles, apparaissent deux à trois mains de fleurs neutres avec toutes les pièces florales avortées, suivies par les mains de fleurs mâles constituées d'ovaires réduits et d'étamines bien développées. Les fleurs mâles tombent au fur et à mesure de leur libération, dénudant ainsi la partie inférieure de la hampe (Fig.7).

Chez certains cultivars, la croissance du méristème terminal de l'inflorescence s'interrompt immédiatement après la sortie des premières fleurs femelles. Mais, en général, la croissance de l'inflorescence se poursuit indéfiniment pour former le bourgeon mâle ou popote (Fig.7), constitué de la superposition des bractées. S'il n'est pas coupé, ce bourgeon mâle prolongera sa croissance jusqu'à la maturité des fruits et la fanaison de la tige.

## **Chapitre 3 : La culture de la banane en Guadeloupe**

### **3.1. Historique**

( Atlas des Départements français d'outre-mer, 1982)

Le bananier est originaire de l'Asie du sud-est et s'est propagé vers l'Afrique de l'ouest à travers la Méditerranée et l'Arabie. Son implantation aux Amériques s'est d'abord faite par la République Dominicaine (en 1516 grâce à des plants en provenance des îles Canaries) et s'est poursuivie vers l'Amérique Centrale et du Sud (Manuel du planteur, 1998).

Le bananier fut introduit en Guadeloupe au 17<sup>ème</sup> siècle et utilisé dans un premier temps comme plante d'ombrage dans les plantations caféières du sud de la Basse-Terre. C'est vers les années vingt

que démarre véritablement la production bananière d'exportation au sein de la Basse-Terre jusque-là pénalisée, à cause de son relief, pour la production sucrière.

C'est en 1928 qu'apparaissent les premières mesures protectionnistes pour la banane française permettant ainsi le développement d'une réelle filière économiquement intéressante.

Peu à peu la zone bananière gagne du terrain et, dans le courant des années soixante, détrône la culture de la canne à sucre dans la région de Capesterre. A l'heure actuelle, les communes de Capesterre, Goyave, Petit-Bourg et Trois-Rivières totalisent plus de 70% des surfaces plantées. La commune de Capesterre en détient plus de 53%.

### **3.2. Itinéraire technique et soins aux bananiers dans les Antilles françaises**

De la plantation à la consommation, la banane dessert d'exportation (Grande Naine du sous-groupe Cavendish AAA) exige de nombreuses opérations détaillées ci-après :

#### **3.2.1. De la plantation à la récolte**

Les soins à effectuer sur la parcelle sont les suivants (Manuel du planteur, 1998) :

- **L'œilletonnage** consiste à sélectionner les rejets qui assureront le renouvellement des bananiers afin de garder la structure de la population constante.
- **L'effeuillage** assure la protection des fruits. Il faut éliminer certaines feuilles susceptibles d'abîmer les fruits par frottement après émergence de la tige.
- **Le marquage** se fait au stade « doigts horizontaux » et permet les prévisions de récolte. En effet, les différents régimes arrivés à ce stade sont marqués d'une bande de couleur spécifique dans le but de connaître leur âge et de prévoir la date de récolte à un âge physiologique déterminé. Les régimes arrivés au stade 900°C jours (voir point 3.2.2.) après le marquage sont récoltés la même semaine et les ouvriers se basent sur la couleur de coupe de la semaine pour effectuer la récolte des régimes. A chaque semaine de marquage correspond une couleur (Fig.9a et 9e).
- **Le haubannage** est une technique qui a pour but d'éviter la chute des régimes sous l'action du vent ou du poids du régime lorsque le système racinaire est défectueux. Le haut de la hampe est ainsi tenu par un ou deux brins de ficelle attachés aux pieds voisins (Fig.9b).

- **L'engainage** consiste à emballer le régime dans une gaine plastique afin de tamponner les variations de température, de présenter une barrière mécanique contre les parasites et de protéger les fruits contre les agressions mécaniques dues par exemple aux frottements des feuilles (Fig.9c).
- **L'ablation des fausses mains et de la popote** assure un bon allongement de l'ensemble des fruits (Fig.9d).

### 3.2.2. La récolte

Les bananes destinées à l'exportation sont récoltées vertes et immatures. L'état physiologique des fruits au moment de la récolte conditionne leur évolution ultérieure en mûrisserie et notamment la vitesse de développement des champignons (Hostachy *et al.*, 1990).

L'intervalle de temps séparant le stade « doigts horizontaux » de la récolte s'appelle l'intervalle fleur-coupe et est soumis à une loi de la température. Il est donc possible de prévoir la récolte à partir de la date de marquage des régimes à l'aide d'une bande de couleur et de l'utilisation des données météorologiques. Le stade optimal de récolte des bananes d'exportation est basé sur la somme thermique de 900°C jours, calculée entre le jour de marquage au stade « doigts horizontaux » et la récolte avec un seuil minima de 14°C considéré comme 0°C. En effet, en dessous de ce seuil de 14°C les températures ne sont pas comptabilisées dans le calcul des 900°C jours.

$$\text{Semaine de récolte} = \text{Somme } (T^{\circ}\text{moyenne/jour} - 14^{\circ}\text{C}) = 900^{\circ}\text{C jours}$$

Une récolte à 900° jours permet un bon compromis entre le remplissage du fruit (grade à la récolte) et son potentiel de conservation appelé « durée de vie verte » qui correspond à l'intervalle de temps séparant la récolte de la crise respiratoire. Cependant, la physiologie de la banane est influencée par de nombreux facteurs qui ne sont pas encore connus ou maîtrisés et le calcul des prévisions de récoltes à 900°C jours n'est pas toujours suffisant pour obtenir un état physiologique reproductible.

La récolte du régime marque le début du dépérissement du pied-mère qui est alors coupé. Sa suppression enlève la dominance apicale sur le rejet préalablement sélectionné et permet de poursuivre la culture.

### 3.2.3. Les opérations à la station d'emballage

Les régimes récoltés sont disposés sur des coussins protecteurs dans un camion avant d'être déchargés et suspendus dans une penderie (Fig.10a). Toutes ces opérations nécessitent beaucoup d'attention. En effet, les blessures occasionnées pendant la récolte et le conditionnement des fruits aggravent les dégâts causés par les champignons durant le transport et le mûrissage, d'où la nécessité de réduire ces blessures (Hostachy *et al.*, 1990).

Arrivés à la station d'emballage, les régimes subissent les opérations successives suivantes (Manuel du planteur, 1998) :

- **L'épistillage** : consiste à enlever le reste des pièces florales à l'extrémité du fruit (Fig.10b).
- **Le dépaillage** : consiste à désolidariser les mains de la hampe florale, en utilisant un couteau courbe et en maintenant une partie suffisante de la couronne sur les mains (Fig.10c). Ceci afin de permettre la découpe en bouquets sans perte de fruits et avec une couronne de section carrée (Fig.10e).
- **La découpe** : les mains sont découpées en bouquets de trois à huit fruits exempts de défaut (Fig.10d). Ceux des extrémités des mains et ceux présentant des défauts sont éliminés.
- **Le trempage** : les fruits sont d'abord plongés dans le bac de dépaillage où les mains sont découpées en bouquets. Ces derniers passent ensuite dans les bacs de rinçage (Fig.10f). Le temps d'immersion dans ces deux bacs doit être suffisant pour permettre l'écoulement du latex au niveau des zones de découpe. Le latex y est flocculé par des agents acidifiants comme le sulfate d'aluminium. Les bouquets sont ensuite récupérés et placés sur des plateaux disposés sur un tapis roulant qui les emmène vers les tunnels de traitement fongicide (Fig.10g).
- **Les traitements fongicides** : visent à réduire le développement de maladies post-récolte et se font principalement par un passage dans un tunnel d'aspersion (Fig.10h).
- **La pesée des fruits et l'emballage** : un assemblage de bouquets doit permettre d'obtenir des cartons de 18,5 kg qui seront stockés sur des palettes empilées dans des containers (Fig.11a). Ceux-ci seront amenés au port et reliés à une prise de froid (Fig.11b). Le délai de coupe/mise au froid ne doit pas excéder 24 h. La mise au froid permet d'une part, de minimiser la production d'éthylène et de retarder le processus de maturité et d'autre part, de réduire le développement de champignons éventuellement présents (Krauss, 2000).

Ces différentes étapes sont schématisées ci-dessous :

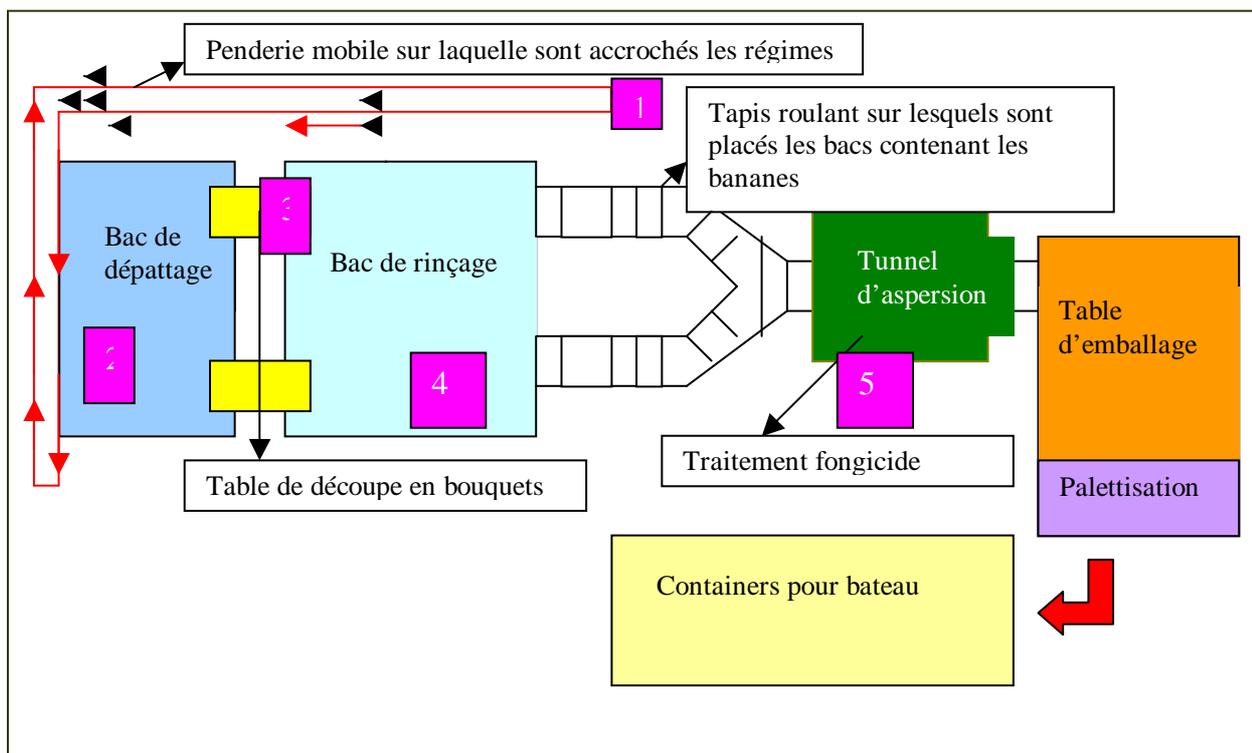


Figure 12 : Exemple de schéma d'une station d'emballage de bananes.

### 3.2.4. Le transport des fruits et leur mise sur le marché

Les cartons de bananes, maintenus à une température de 13°C afin de ralentir leur activité métabolique, sont transportés par bateau (Fig.11c). Le transport dure une dizaine de jours et les bananes sont principalement déchargées à Dunkerque.

La banane est un fruit climactérique et sa maturation est initiée par une crise respiratoire et une synthèse endogène d'éthylène. La période séparant la récolte de l'initiation de la maturation est appelée « durée de vie verte » (DVV). Les bananes d'exportation doivent avoir une DDV supérieure au temps du transport en bateau. Dans ce cas, la fin de la DDV coïncide avec le déclenchement artificiel en mûrisserie de la maturation des bananes.

Arrivées en France les bananes subiront, avant d'être mises sur le marché, un traitement en mûrisserie de quelques jours afin de déclencher artificiellement la maturation par un apport d'éthylène exogène pendant 24 heures, à une dose de 1000µl/L et à une température de 14°C-18°C.

Si la durée de vie verte des bananes est inférieure à la durée du transport en bateau, les bananes arrivent mûres en France et ne peuvent être commercialisées. Ce phénomène s'appelle les « mûrs d'arrivage ». Par ailleurs, les pourritures de couronne ont un effet sur la réduction de la DDV et provoquent régulièrement des « mûrs d'arrivage ».

## **Chapitre 4 : La maladie de la pourriture de couronne**

### **4.1. Introduction**

La pourriture de couronne est l'une des principales maladies de post-récolte des bananes d'exportation (Krauss *et al.*, 1998). Elle affecte les tissus réunissant les pédoncules entre eux et qui sont appelés la couronne. Il s'agit d'une infection latente et complexe qui résulte de l'activité de plusieurs champignons à laquelle s'ajoute parfois celle d'autres micro-organismes tels que des bactéries et qui affecte sévèrement la qualité des fruits (Lukezic *et al.*, 1967).

Cette mauvaise qualité est caractérisée par le développement de nécroses sur les fruits et de « mûrs d'arrivage ». Ces derniers sont provoqués par l'éthylène provenant des tissus nécrosés et des champignons. Il en résulte une maturation accélérée des fruits qui entraîne une dévalorisation du produit, des difficultés de commercialisation sur le marché européen et donc des pertes économiques importantes (Nolin, 1989). Le plus souvent invisible au moment de la récolte, cette maladie évolue durant le transport et surtout au cours du mûrissage lorsque la physiologie de la peau du fruit subit des modifications qui permettent au mycélium présent dans l'épiderme de se développer (Hostachy *et al.*, 1990).

A l'état naturel, la peau solide de la banane protège le fruit des maladies fongiques mais les grandes plaies ouvertes, résultant de la découpe des mains, constituent un point de pénétration idéal pour les champignons de la pourriture de couronne qui peuvent ainsi coloniser le fruit et s'y développer. Les champignons envahissent le fruit sous forme de spores microscopiques.

### **4.2. Origine**

Jusqu'en 1960, la variété Gros-Michel, principale variété d'exportation, était transportée par régimes entiers pour des raisons économiques et pratiques. Les régimes ne subissaient donc pas d'opérations de découpe préalablement au transport. Cependant, cette variété était particulièrement sensible à la maladie de Panama (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*). Elle fut remplacée par le

cultivar Grande-Naine de la variété Cavendish qui présente l'avantage d'être résistant à la maladie de Panama mais qui est plus fragile durant le transport (Eckert et Ogawa,1985). De ce fait, celui-ci ne pouvait plus se faire par régimes entiers. Ces derniers sont donc actuellement découpés en bouquets offrant un site d'infection aux différents pathogènes au niveau de la couronne.

### **4.3. Symptômes**

(Jones, 1999)

La pourriture de couronne est une pourriture molle, brune ou noire qui se répand au sein de la couronne et peut pénétrer jusqu'au pédicelle des doigts individuels. Elle provoque un ramollissement et un noircissement des tissus sur la plaie de découpe des mains (Fig.13). La pourriture se propage rapidement lors de la maturation des fruits et peut, dans des cas extrêmement sévères, pénétrer à l'intérieur des fruits, atteindre la pulpe et les déclasser complètement (Ploetz *et al.*, 1994). Lorsque le complexe a pénétré profondément dans la couronne, les doigts peuvent se détacher du coussinet (Fig.14).

La couronne est recouverte d'une couche de mycélium cotonneux blanc, gris ou rose (Fig.13). Le mycélium et les nécroses ternissent l'aspect frais et propre du fruit à la maturation.

La sévérité de la maladie est imprévisible et il est parfois difficile d'expliquer pourquoi certaines des mains emballées dans un carton sont infectées alors que d'autres ne le sont pas.

Les symptômes de pourriture de couronne ne se manifestent généralement que lors de la maturation des fruits. De plus, le développement de la maladie stimule la maturation, ce qui provoque des mûrs d'arrivage, autre source de pertes (Slabaugh et Grove, 1982).

L'importance de l'incidence de la maladie augmente avec la durée du transport en bateau (Ploetz *et al.*, 1994)

### **4.4. Agents pathogènes**

Comme expliqué précédemment, la pourriture de couronne est le résultat de l'action d'un complexe parasitaire. La gravité des dégâts sur la couronne ainsi que la nature du complexe parasitaire associé varient énormément selon les zones de production et la période de l'année (Hostachy *et al.*, 1990 ; Slabaugh et Grove, 1982). Le tableau 1, au verso de cette page, donne une liste de champignons

impliqués dans le complexe parasitaire et isolés de différentes régions de production de bananes (Meredith, 1971).

Lukezic et Kaiser (1966) ont également montré que les populations de champignons rencontrées sur les bananiers étaient différentes d'un individu à l'autre et d'une couronne à l'autre. Occasionnellement, il est également possible de rencontrer des bactéries qui, selon certains auteurs, pourraient produire des enzymes contribuant à la dégradation des tissus mais ceci n'a pas encore été confirmé par des recherches détaillées (Johanson et Blazquez, 1992).

Bien que les populations de pathogènes présents dans l'infection soient très variables, on peut remarquer que les champignons les plus fréquemment associés à la pourriture de couronne dans les Antilles sont *Colletotrichum musae*, *Fusarium palidoroseum*, *Verticilium theobromae*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Botryodiplodia theobromae* et certains *Cephalosporium* (Finlay et Brown, 1993).

*Colletotrichum musae* est considéré comme un pathogène primaire. Le rôle primaire ou secondaire des *Fusarium* est encore discuté et les autres sont considérés comme des pathogènes secondaires (Finlay et Brown, 1993; Krauss, 1996; Knight, 1982). Ils requièrent des niveaux d'inoculum plus importants que *C. musae* pour provoquer des symptômes (Krauss *et al.*, 1998).

#### 4.1.1. *Colletotrichum musae* (Berk. And Curt.)

Les problèmes causés par *C. musae* se rencontrent sur une large gamme de plantes aussi bien en pré- qu'en post-récolte et ce partout dans le monde (Jeffries *et al.*, 1990). *C. musae* est également l'agent responsable de l'antracnose du bananier.

Le genre *Colletotrichum* regroupe les champignons imparfaits cloisonnés appartenant à l'ordre des Mélanconiales (de Lapeyre de Bellaire, 1999). Les conidies de *C. musae* sont hyalines, unicellulaires, rarement multicellulaires, en fonction des conditions (Jeffries *et al.*, 1990), elliptiques ou falciformes, non septées et produites apicalement sur les conidiophores contenus dans des acervules (Jones, 1999). Les acervules, en forme de disque, sont cireuses, subépidermiques avec des soies noires typiques sur le sommet ou dans les conidiophores qui sont simples et allongés (Fig.15).

Les conidies sont produites dans un mucilage et agglutinées en masses dans les acervules (Simmonds, 1941). Ce mucilage semble être un élément important dans la survie des conidies. Si elles

sont plongées dans l'eau avant d'être séchées, elles perdent rapidement leur viabilité (Simmonds, 1941).

Il apparaît que, dans la plupart des cas, *C. musae* est le premier à coloniser les tissus et ce, à partir d'un faible niveau d'inoculum (Finlay et Brown, 1993). Il établit une infection latente au champ durant les premiers stades de développement du fruit (Krauss *et al.*, 1998).

L'optimum de température pour la sporulation de *C. musae* sur des bananes mûres se situe entre 30 et 35° C. Il n'y a pas d'infection en dessous de 7,5° C (Misra et Singh, 1962).

Les principales sources d'inoculum de *C. musae* sont les pièces florales et les bractées (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2000). L'eau joue un rôle important dans la dispersion des spores et dans l'infestation du fruit. La plupart des spores sont produites dans les 40 jours suivant la floraison. Ensuite la production diminue rapidement (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2000).

Les conidies de *C. musae* peuvent germer à la surface des fruits matures et immatures (Jeffries *et al.*, 1990).

#### 4.1.2. *Fusarium moniliforme* J. Sheld.

Le genre *Fusarium* regroupe les *Ascomycota* de l'ordre des Hypocreales et de la famille des *Hypocreaceae*. *F. moniliforme* est un saprophyte des organes floraux sénescents du bananier (Jones, 1999). Les microconidies sont abondantes et initialement non septées. Elles sont ovoïdes ou ont la forme d'un club de golf et forment de longues chaînes (Nelson *et al.*, 1983) (Fig.16 et 17).

Les conidies de *Fusarium* sont dispersées par la pluie mais aussi par le vent surtout lors des périodes de sécheresse (Lukezic *et al.*, 1967).

L'optimum de température pour la croissance de *Fusarium moniliforme* est de 24,3 °C (Marin *et al.*, 1996).

*F. moniliforme* est l'agent causal de la pourriture du pseudo-tronc et fait aussi partie du complexe causant le « tip-end rot » (Jones, 1999).

#### 4.1.3. *Cephalosporium* sp.

Le genre *Cephalosporium* regroupe les champignons appartenant aux *Ascomycota* de l'ordre des Hypocreales et de la famille des *Hypocreaceae*.

Les conidiophores sont simples. Les conidies sont hyalines, simplement septées et produites successivement au sommet ou de manière endogène chez certaines espèces. Elles sont contenues dans une masse gélatineuse (Barnett, 1965) (Fig.18 et 19).

#### 4.5. Cycle infectieux

L'épidémiologie de la maladie reste relativement peu comprise (Krauss, 1996). En effet, le nombre élevé de pathogènes impliqués dans le complexe, ayant chacun leurs propres caractéristiques, complique l'étude du cycle infectieux. Certaines caractéristiques générales peuvent toutefois être citées.

Badger (1965) a montré qu'une humidité relative de 86% et plus est nécessaire pour permettre la germination des conidies de la plupart des champignons impliqués dans la pourriture de couronne. Les conidies peuvent rester plusieurs mois dans des conditions extrêmes de température et d'humidité avant de germer (Meredith, 1971). La figure 20 retrace les différentes étapes entre l'adhésion des spores sur le matériel végétal et le développement des lésions.

Les différents agents pathogènes impliqués dans le complexe sont généralement trouvés sur les feuilles, les fleurs et les bractées du bananier. Ils sporulent sur les débris de culture et sont disséminés par le vent et par la pluie sur toutes les parties du fruit. Dans le cas de *C. musae*, la principale source d'inoculum est encore débattue. En effet, pour certains auteurs, les principales sources d'inoculum sont les pièces florales (Agatti, 1992) et les bractées (Lukezic et Kaiser, 1966), tandis que selon Simmonds. (1941) et Meredith (1962) il s'agit des feuilles sénescents. Par contre, il semble que seules les pièces florales servent de support aux *Fusarium sp.* (Mourichon, 1993).

Bien qu'une infection au champ ne soit pas à exclure, c'est principalement au moment de la récolte et de la découpe des régimes en bouquets qu'ont lieu les infections. Comme représenté sur la figure 21, lorsque les régimes sont récoltés il y a une exportation de l'inoculum se trouvant sur les fruits eux-mêmes ou sur les organes floraux sénescents. Les contaminations se passent sur les sites de coupures au niveau de la couronne et s'effectuent principalement soit lors de la découpe des mains avec des couteaux contaminés, soit lors du passage des bouquets dans les bassins d'eau contaminés (Shillingford, 1977). Les spores provenant des fruits et des organes floraux sénescents restant attachés aux fruits ont tendance à s'accumuler dans les eaux de lavage (Slabaugh et Grove, 1982). Les spores présentes dans ces bassins augmentent avec le nombre de mains immergées et peuvent pénétrer de quelques millimètres dans le système vasculaire au niveau du site de coupure. Green et Goos ont

montré que, dans une suspension de spores de *C. musae*, il ne faut que trois minutes pour que les spores pénètrent de 5 à 7 mm dans les tissus (Meredith, 1971).

Comme il s'agit d'une infection latente de post-récolte, celle-ci n'est ni visible ni prévisible au moment de la récolte ou lorsque les bouquets sont emballés pour l'exportation. Il faut attendre la maturation des fruits pour voir apparaître les symptômes (Jeffries *et al.*, 1990 ; Krauss *et al.*, 1998) et les fruits sont déclassés après leur transport en bateau.

#### **4.6. Contrôle de la maladie**

La maladie est particulièrement difficile à contrôler de part sa complexité, le nombre de pathogènes différents impliqués et la difficulté d'atteindre correctement les sites potentiels d'infections avec les fongicides (Slabaugh et Grove, 1982 ; Eckert et Ogawa, 1985). Nolin (1989) cite trois facteurs qui interviennent dans le développement de la maladie et dans son contrôle :

1. l'état physiologique du fruit en rapport avec le stade de récolte, les conditions climatiques au cours de la phase de croissance du régime et la nutrition minérale et hydrique,
2. l'aspect extérieur (grattages, pliures, blessures diverses...) en liaison avec les contraintes mécaniques qui s'exercent sur le fruit au cours de la récolte, de l'emballage et du transport,
3. l'efficacité des traitements fongicides selon leur nature et la technique de traitement.

##### **4.6.1. Méthode culturale**

###### **4.6.1.1. Le nettoyage des parcelles et des stations d'emballage**

La lutte contre les pourritures de couronne commence au champ où il faut régulièrement procéder à l'enlèvement des déchets de cultures car les vieilles feuilles, bractées et autres déchets de cultures ont été identifiés comme étant des sources majeures d'inoculum. Leur élimination régulière du voisinage des fruits permet de réduire la pression d'inoculum et donc le taux de développement de la maladie (Slabaugh et Grove, 1982). Simmonds (1941) a observé qu'en général, le développement de l'antracnose causée par *C. musae* est plus important sur les parcelles mal entretenues. De même, tous les déchets se trouvant à proximité des lieux d'emballage des fruits sont systématiquement éliminés (Krauss et Johanson, 2000).

#### 4.6.1.2. L'âge et le grade à la récolte

Pour un même grade, c'est-à-dire pour des fruits présentant le même remplissage, les jeunes fruits sont moins sensibles que les plus âgés (Krauss et Johanson, 2000). De ce fait, l'âge et le grade doivent être pris en considération à la récolte. Afin d'accélérer le développement des fruits et ainsi réduire leur âge à la récolte, on procède à l'ablation des fausses mains, des deux dernières vraies mains et de la popote au moment du marquage. Cette opération assure, par une meilleure nutrition du régime, un bon allongement de l'ensemble des fruits et limite les doigts courbés, source de grattages importants (Krauss et Johanson, 2000).

#### 4.6.2. La manipulation des fruits et les traitements au hangar d'emballage

##### 4.6.2.1. L'épistillage

L'épistillage s'effectue à la station d'emballage et supprime les pièces florales susceptibles d'être porteuses d'inoculum. Cette opération permet ainsi de diminuer le risque de contamination dans les différents bains (Krauss et Johanson, 2000).

##### 4.6.2.2. La découpe des mains hors de la parcelle

Dans certaines régions, la découpe des mains se fait au champ mais il a été montré que la découpe des régimes au hangar permet de diminuer les infections (Jones, 1999).

##### 4.6.2.3. La diminution des chocs

Eviter les chocs lors de la récolte et tout le long de la filière est particulièrement important car ils provoquent des modifications physiologiques du fruit et facilitent le développement des pourritures.

La récolte s'effectue parfois grâce à un système de transport par câble. Afin de réduire les chocs, les régimes y sont suspendus et transportés de la parcelle jusqu'à la station d'emballage (Fig.22). Généralement, dans les Antilles françaises, les régimes sont déposés dans des berceaux individuels matelassés et transportés dans une remorque à étage (Fig.10a).

#### 4.6.2.4. La qualité de l'eau

Une eau propre et fréquemment renouvelée dans les bacs de rinçage et de délatexage permet de limiter l'accumulation de spores et de diminuer l'inoculum (Slabaugh et Grove, 1982). On conseille également de traiter l'eau de ces bacs avec des désinfectants à base de chlore (Slabaugh et Grove, 1982 ; Eckert et Ogawa, 1985) ou d'ammoniums quaternaires (Shillingford, 1977), mais l'efficacité de ceux-ci est régulièrement remise en cause ( Slabaugh et Grove, 1982 ; Eckert et Ogawa, 1985).

#### 4.6.2.5. La découpe des couronnes

Après avoir trempé dans les bains, les couronnes sont rafraîchies au couteau. Il semble que ceci permet de diminuer nettement le taux d'infection. Il est supposé que, par cette action, l'inoculum pouvant se trouver sur la couronne est éliminé avant sa progression à l'intérieur des tissus. La coupe effectuée avec une lame propre en acier inoxydable doit être nette et franche afin d'éviter des fragments de tissus pouvant se déshydrater et devenir ainsi des sites potentiels d'infection par le complexe (Jones, 1999 ; Krauss et Johanson, 2000). De plus, l'extrémité des couteaux de découpe de bananes est arrondie afin de prévenir les blessures des doigts (Krauss et Johanson, 2000).

### 4.6.3. Lutte chimique

L'utilisation régulière de fongicides date de la fin des années soixante lorsque les fongicides systémiques dérivés du benzimidazole (thiabendazole et benomyl) sont apparus. Ils appartiennent à la catégorie des anti-mitotiques. Dans les Antilles, les techniques de traitements sont très variées: trempages, tunnels d'aspersion, pistolets, etc...Mais il semble qu'un bon mouillage des fruits soit essentiel pour assurer une bonne efficacité des traitements fongicides (de Lapeyre de Bellaire et Nolin, 1994). Ces derniers sont appliqués entre la découpe des bouquets et leur emballage dans les cartons d'exportation.

En Guadeloupe, les produits utilisés en post-récolte ont le même mode d'action que ceux appliqués aux champs pour lutter contre une maladie foliaire du bananier: la cercosporiose (*Mycosphaerella musicola*). L'apparition de souches résistantes au thiabendazole, déjà observée (de Lapeyre de Bellaire et Dubois, 1997), est consécutive à l'emploi exclusif du benomyl durant une longue période (1972-1982) en traitement aérien. Les résultats d'une étude, effectuée par de Lapeyre de Bellaire et Mourichon (1997), ont clairement montré que la résistance au thiabendazole est largement répandue dans les plantations de Guadeloupe. Vingt-trois pourcents de tous les isolats de *C.*

*musae* évalués ont montré une résistance au thiabendazole. L'apparition de souches résistantes a été observée dans les autres zones de productions bananières (Krauss et Johanson, 2000 ; Johanson et Blazquez, 1992).

Ceci représente une limite au recours à la lutte chimique, même si de nouvelles matières actives, comme le bitertanol, ont été homologuées récemment pour le traitement post-récolte des bananes. Ce dernier est un fongicide agissant sur la biosynthèse de l'ergostérol. A terme, son efficacité est aussi menacée car des traitements ayant le même mode d'action sont utilisés depuis 1984 pour lutter contre la cercosporiose du bananier. De plus, les consommateurs sont devenus de plus en plus soucieux de la préservation de l'environnement et de la santé et se tournent préférentiellement vers des produits n'ayant pas fait l'objet de traitements fongicides post-récolte. Les recherches vont donc dans le sens de mise au point de nouvelles stratégies de contrôle afin de limiter la lutte chimique.

#### 4.6.4. Lutte physique

##### 4.6.4.1. La température de conservation

Une rapide mise à froid après la récolte permet de protéger les fruits de la maladie. Cette mise à froid doit être continue de la récolte à la mûrisserie (Krauss et Johanson, 2000). La croissance des champignons du complexe est favorisée par des températures comprises entre 25°C et 30°C et est ralentie à température froide (13,3°C-13,5°C)(Finlay et Brown, 1993). Ces températures sont donc un bon compromis entre les températures nécessaires à la conservation des bananes et celles permettant de freiner la colonisation du champignon. La durée entre la récolte et la mise à froid est importante dans le développement de la maladie. La température joue non seulement un rôle dans le développement des champignons, mais aussi sur la physiologie et la maturation du fruit. Ces deux paramètres ayant eux-mêmes une influence sur l'incidence de la maladie (Finlay et Brown, 1993).

##### 4.6.4.2. L'utilisation d'atmosphères modifiées

(Chillet et de Lapeyre de Bellaire, 1996a)

L'utilisation d'un conditionnement en sac polyéthylène clos (polybag) entre aussi dans la réalisation d'une lutte physique raisonnée. L'intérêt des polybags a été comparé à celui d'un emballage classique en polyfilm. Pendant une période de conservation de 28 jours à 13,5°C, la vitesse de développement des nécroses dues à *Colletotrichum musae* et la vitesse de maturation des fruits ont été considérablement ralenties tant que les polybags ont été maintenus fermés. Cet effet résulte d'une modification de l'atmosphère à l'intérieur des polybags. Cette modification est caractérisée par une

augmentation de l'humidité relative et par un changement des teneurs en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dans l'emballage. En effet, la perméabilité sélective des membranes entraîne une baisse de la teneur en O<sub>2</sub> et une augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub>. Cette modification de la composition gazeuse, qui réduit l'intensité respiratoire des fruits et limite la synthèse d'éthylène endogène, permet d'augmenter considérablement la durée de la phase préclimactérique. Ces atmosphères modifiées ont aussi la propriété d'inhiber le métabolisme de certains agents pathogènes. Les modifications intervenant dans la composition de l'atmosphère à l'intérieur des emballages pourraient, soit avoir un effet direct sur l'activité des pathogènes présents, soit intervenir sur la physiologie du fruit, engendrant indirectement une inhibition du développement du champignon, donc des nécroses. La résistance mécanique de ces sacs doit être importante car la moindre déchirure empêche l'établissement d'une atmosphère modifiée.

#### 4.6.4.3. Le Traitement aux U.V.

L'utilisation potentielle des U.V. dans le domaine de la conservation des fruits et légumes est réelle et les effets observés au niveau expérimental ne manquent pas d'intérêt.

Cependant, sur les bananes, Misra et Singh (1962) ont observé une coloration rouge-rosée des fruits mûris après exposition aux U.V. D'après Joas (1997), la « dose-seuil » d'altération de la peau est nettement plus faible que celle du contrôle du chancre. Il semblerait que la sensibilité de la peau aux U.V est trop importante pour envisager une régulation post-récolte de *C. musae* par un traitement de type U.V.(Joas, 1997).

#### 4.6.4.4. Le traitement à l'eau chaude

Selon Burden (1968), les traitements à l'eau chaude permettent de détruire les conidies des champignons. En laboratoire, les bananes inoculées artificiellement par *C. musae* sont trempées pendant deux minutes dans l'eau chaude à 55°C avant la maturation. Ceci permet un contrôle complet de la maladie. Cependant les essais réalisés à échelle commerciale, avec des fruits contaminés de manière naturelle, ne permettent pas l'obtention d'un contrôle total de la maladie. De plus, des retards de maturations ont été constatés.

#### 4.6.5. Lutte biologique

Un certain nombre de travaux sur la lutte biologique contre *Colletotrichum* sp. sur bananes sont décrits dans la littérature. Il ressort généralement que les agents antagonistes montrant des résultats assez prometteurs lors de tests *in vitro*, ne sont plus intéressants dans des essais *in vivo*. La méthode de tests *in vitro* pour la détection d'agents antagonistes est souvent critiquée car l'antagonisme détecté *in vitro* n'est pas toujours confirmé *in vivo* (Krauss *et al.*, 1998).

Des méthodes ont été développées, afin de se rapprocher de la réalité des interactions existantes, en travaillant sur du matériel vivant comme des disques foliaires de bananes (Postmaster *et al.*, 1997) ou sur des disques de fruits (Krauss, 1996). Dans les tests *in vitro*, seul l'antibiose a la possibilité d'être mise en évidence. Les autres modes d'action ne peuvent s'exprimer et ne sont donc jamais détectés.

Des champignons, des levures mais aussi des bactéries (De Costa et Subasinghe, 1998) ont montré un antagonisme. Chaque auteur sélectionne des antagonistes qui lui sont propres mais il ressort que *Gliocladium* sp., *Penicillium* spp. et *Trichoderma* spp. sont souvent cités comme agents antagonistes contre *C. musae* sur bananes.

D'autres agents antagonistes, permettant une réduction significative des lésions sur fruits causées par *Colletotrichum*, ont été identifiés. C'est le cas notamment de deux champignons : *Acremonium strictum* (Ragazzi et Turco, 1997) et *Talaromyces flavus* (Magan et Baxter, 1993) qui ont montré une efficacité *in vitro*. *Bacillus* spp., est capable de contrôler *in vivo* les infections dues à *Colletotrichum* sur mangues et avocats (De Jager *et al.*, 2001). Cette bactérie peut être appliquée plusieurs fois au champ avant la récolte ou en traitement localisé aux sites de blessures après la récolte.

Chuang et Yang (1993) ont identifié 4 bactéries et 5 levures, ayant un effet antagoniste contre la germination des spores de *C. musae*, à partir des bananes à Taïwan. Ils ont également mis en évidence que l'efficacité du traitement augmente avec la concentration de l'antagoniste.

Krauss *et al.*(1998) ont étudié les feuilles sèches, les résidus des fleurs sèches, les feuilles vertes et les bananes vertes comme source de mycoparasites contre *Colletotrichum*. Il en ressort que les feuilles sèches sont les sources les plus intéressantes et que c'est sur les organes verts que l'on retrouve le moins d'isolats. Ils ont sélectionné *Pythium* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., et *Verticillium* sp.. Les trois premiers ont également été cités par Kanapathipillai *et al.*(1987) comme ayant un effet antagoniste *in vitro* envers la croissance mycelienne et la germination des spores de *C. musae*.

Postmaster *et al.* (1997) ont montré que des levures avaient une action fortement antagoniste lorsqu'elles étaient installées de 24 à 48 heures avant l'inoculation des feuilles de bananes par des conidies de *C. musae*. De plus, toujours selon ces auteurs, les levures présentaient une meilleure efficacité par rapport aux champignons mycéliens ou aux bactéries sélectionnés, alors qu'*in vitro* les champignons semblaient offrir un meilleur niveau d'inhibition du pathogène. Ils ont également observé que certains champignons causaient des nécroses sur feuilles alors que ce phénomène n'avait jamais été observé avec les levures. Les trois levures isolées étaient *Rhodotrula glutinis*, *Cryptococcus albidus* et *Cryptococcus laurentii*.

## Chapitre 5 : La lutte biologique

### 5.1. Introduction

C'est au début du 20<sup>ème</sup> siècle que l'appellation « lutte biologique » fut proposée pour désigner les méthodes phytosanitaires mettant en œuvre des organismes vivants. C'est à la même époque que l'industrie agropharmaceutique se développa freinant ainsi les progrès en matière de lutte biologique. Il fallut attendre la prise de conscience du coût environnemental des molécules de synthèses et les craintes formulées par les consommateurs pour observer un regain d'intérêt pour la lutte biologique.

De plus, à l'heure actuelle, les industries phytosanitaires sont confrontées à quatre grands problèmes :

- l'augmentation de résistance aux pesticides chimiques,
- la législation phytosanitaire de plus en plus sévère,
- les mouvements politiques favorisant les moyens de luttés alternatifs,
- la méfiance grandissante des consommateurs vis-à-vis de la lutte chimique.

Les consommateurs et les distributeurs sont à la recherche de produits dits « biologiques ». Si la lutte biologique n'y mène pas nécessairement, elle s'insère parfaitement dans un programme de lutte intégrée (avec ou sans autres méthodes alternatives) qui a pour objectif une diminution de la dépendance envers les pesticides.

Quelques antagonistes font déjà l'objet d'une commercialisation. Par exemple, Biosave (*Pseudomonas syringae*, ESC-11 ; Ecogen Inc.) et Aspire (*Candida oleophila*, I-182 ; Ecoscience Crop) sont deux produits de biocontrôle qui offrent une protection sur pommes contre *B. cinerea* et *Penicillium* spp.

### 5.2. Définition de la lutte biologique

Un grand nombre de définitions de la lutte biologique est proposé par différents organismes. Ces définitions varient selon la discipline scientifique, le domaine d'application et le pays concerné.

La définition proposée par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) est la suivante : « La lutte biologique consiste à utiliser des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs et agents phytopathogènes. »

### 5.3. La lutte biologique dans le domaine du post-récolte

#### 5.3.1. Introduction

Le nombre d'agents de lutte biologique homologués pour le contrôle des maladies reste pour l'instant très limité. Cette faible utilisation des biopesticides peut s'expliquer, principalement, par un manque d'efficacité aux champs (influence des facteurs environnementaux, manque de persistance d'action), par une durée de vie réduite du produit au cours du stockage, par des formulations peu adaptées à l'usage des produits, par un spectre d'action trop spécifique et par un manque de concurrence économique par rapport aux traitements chimiques. D'autres inconvénients à l'utilisation des agents de lutte biologique sont : le risque d'instabilité génétique, la difficulté de l'association avec d'autres pratiques culturales acceptées, le coût des tests de toxicité et d'homologation trop élevé pour le marché cible (Wipps et Lumsden, 2001).

#### 5.3.2. Avantage du post-récolte pour un traitement avec des agents biologiques

L'application d'une stratégie de lutte biologique en post-récolte paraît prometteuse car le manque d'efficacité des biopesticides souvent observé aux champs pourrait être surmonté pour les raisons suivantes (Jijakli *et al.*, 1999) :

- le site d'application du traitement est limité sur le fruit,
- les conditions environnementales sont définies et stables au cours du stockage,
- la haute valeur ajoutée des fruits permet des coûts de traitement plus importants.

### 5.4. Applications aux champs ou après la récolte pour contrôler les maladies de post-récolte

La principale stratégie pour contrôler les maladies de conservation des fruits est d'appliquer l'antagoniste dès les fruits récoltés. Mais les maladies latentes de post-récolte, comme les pourritures de couronne, résultant notamment des opérations de récoltes, sont difficilement contrôlables par des applications post-récoltes de BCA (Biological Control Agent). L'application aux champs de BCA peut être une stratégie appropriée pour le contrôle de ces maladies. Des résultats encourageants sur le contrôle par traitement de pré-récolte de l'antracnose causé par *Colletotrichum* sp. sur mangues et avocats ont déjà été mis en évidence. Pour avoir un effet significatif, ces applications doivent être répétées et les BCA doivent être capables de tolérer une faible disponibilité en nutriments, des radiations UV, des conditions de température et d'humidité très variées (Ippolito et Nigro, 2000).

## 5.5. Etapes du développement de la lutte biologique

Les premières phases du développement d'un produit de contrôle biologique sont semblables à celles rencontrées dans la recherche de nouvelles molécules actives : effectuer un screening à la recherche d'une possible activité, rechercher une grande efficacité dans les conditions réelles et proposer une formulation adéquate qui répond aux attentes des utilisateurs (Jijakli *et al.*, 1999).

Par contre, vu qu'il s'agit d'organismes vivants, les étapes de production en masse, l'étude du mode d'action et de leur innocuité sont sensiblement différentes des pesticides chimiques (Jijakli *et al.*, 1999).

### 5.5.1. Isolement et sélection des agents antagonistes

Il s'agit des deux premières étapes qui vont conditionner la réussite future du développement d'un biopesticide.

La meilleure période d'isolement des antagonistes dépend souvent du pathogène à combattre et de l'étape du cycle infectieux visé (Jijakli, 2003).

Dans la sélection d'agents antagonistes contre les maladies de post-récolte, il est courant d'effectuer la sélection à partir des fruits eux-mêmes juste avant la récolte ou au cours de la conservation de ceux-ci (Janisiewicz, 1991). Cependant, il n'existe pas une relation absolue entre l'efficacité et l'origine du BCA. Des micro-organismes sélectionnés pour leur efficacité contre *B. cinerea* et *P. expansum* ont été isolés à partir du sol, feuilles, fruits du pommier ou encore à partir d'autres plantes (Janisiewicz, 1988).

Dès qu'une collection de micro-organismes est constituée, la sélection des souches antagonistes les plus efficaces peut être établie. L'évaluation des propriétés antagonistes se fait de préférence *in situ* car cette méthode respecte davantage les conditions dans lesquelles la protection devra opérer.

#### Les propriétés d'un antagoniste idéal (Jijakli, 2003) :

- Génétiquement stable
- Efficace 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
- Préparation facile et efficace de l'inoculum

- Absence de production de métabolites secondaires toxiques
- Résistance aux pesticides
- Compatibilité avec d'autres traitements
- Non pathogénicité pour l'homme et éco-toxicologie acceptable

#### Paramètres influençant le niveau de protection

Le premier paramètre ayant une influence sur le niveau de protection par les levures est le temps d'incubation avant l'inoculation des pathogènes (Jijakli *et al.*, 1993 ; Postmaster *et al.*, 1997). En effet, il apparaît clairement que la protection augmente avec le temps séparant l'application de la levure et celle du pathogène.

Ces auteurs ont également mis en évidence la relation proportionnelle entre la concentration en spores du pathogène et la concentration requise en antagonistes pour avoir une protection.

Les paramètres environnementaux, tels que la température et l'humidité lors du stockage, ont aussi été identifiés comme intervenant dans le niveau de protection.

#### 5.5.2. Production en masse et formulation

(Jijakli *et al.*, 1999)

Lorsque le nombre de souches candidates est suffisamment réduit, les propriétés technologiques des micro-organismes sont évaluées. La production et la formulation doivent aboutir à un produit qui possède certaines caractéristiques telles que la stabilité au stockage, la facilité de préparation et d'application, un coût de revient acceptable.

Des adjuvants de formulations peuvent être ajoutés afin d'optimiser l'efficacité de l'agent antagoniste.

#### 5.5.3. Etude des modes d'actions

L'étude des mécanismes d'action est une étape importante dans le développement d'une lutte biologique et dans le succès d'une stratégie de biocontrôle car elle permet (Jijakli, 2003) :

- d'optimiser la méthode et la période d'application de l'antagoniste,
- de développer des formulations adéquates qui permettent et stimulent l'expression de l'antagonisme,

- de développer une méthode rationnelle pour la sélection d'antagonistes plus efficaces,
- de faciliter l'homologation de l'agent de biocontrôle.

Cependant, la connaissance des modes d'action est souvent superficielle, les interactions entre plante-hôte, pathogènes, antagonistes et autres micro-organismes naturellement présents étant très complexes. De plus, toutes ces relations sont influencées par les conditions environnementales. Ainsi la mise en évidence du mode d'action des agents de biocontrôle rencontre d'énormes difficultés signalées par de nombreux auteurs. En effet, l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* à la réalité est souvent problématique. L'identification du mode d'action est fréquemment basée sur une série d'évidences indirectes et non sur une démonstration complète du phénomène (Jijakli, 2003).

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

#### 5.5.3.1. L'antibiose

La sécrétion par des micro-organismes de substances antibiotiques est un phénomène très commun dans la nature. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique. En effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence la production *in vitro* des antibiotiques et ont évalué l'implication de ces substances dans les propriétés de biocontrôle de certains micro-organismes (Cook *et al.*, 1995 ; Bélanger *et al.*, 1995).

Cependant, la production d'antibiotiques en culture *in vitro* n'est pas toujours corrélée avec la production au niveau des sites d'action *in vivo*. L'antibiose n'a jamais été mise en évidence chez les levures antagonistes vis-à-vis de phytopathogènes (Jijakli, 2003).

L'utilisation d'agents de lutte biologique agissant par ce mode d'action peut présenter certains inconvénients. Outre les problèmes de toxicité de ces composés vis-à-vis des consommateurs, il faut tenir compte de la possibilité de l'apparition de phénomènes de résistance, comme dans le cas de l'utilisation de fongicides synthétiques, chez les pathogènes.

#### 5.5.3.2. La compétition

Ce mécanisme intervient quand les différents organismes impliqués occupent la même niche écologique. Les compétitions pour les nutriments, pour l'oxygène ou pour l'espace sont les plus habituelles.

Grâce à leur ratio surface-volume, les bactéries et les levures sont capables d'utiliser les ressources énergétiques plus rapidement et en plus grande quantité que les champignons (Droby et Chalutz, 1994).

Pour être un bon compétiteur, l'antagoniste doit posséder les caractéristiques suivantes (Droby et Chalutz, 1994) :

- être mieux adapté que le pathogène aux conditions nutritionnelles et environnementales du site,
- utiliser efficacement les éléments nutritifs en basses concentrations,
- croître rapidement sur les blessures,
- être capable de survivre et de se développer sur la surface des denrées et sur le site potentiel d'infection à des conditions de température, pH et osmotique extrêmes.

La démonstration expérimentale de la compétition est difficile à cause du caractère polygénique de ces propriétés et du fait qu'elle met en jeu des fonctions impliquées dans le métabolisme de base du micro-organisme.

#### 5.5.3.3. Le parasitisme

Le mycoparasitisme suppose l'utilisation du pathogène comme ressource nutritive pour l'antagoniste. Généralement, différentes enzymes extracellulaires sont impliquées telles que les chitinases, les cellulases et les  $\beta$ -1,3-glucanases qui sont capables de lyser les parois fongiques.

#### 5.5.3.4. L'induction de la résistance chez la plante-hôte

(Jijakli, 2003)

L'induction de la résistance a également été considérée comme mécanisme d'action de certains organismes. Ils stimulent des mécanismes de résistance comme la formation de barrière structurale ou l'accumulation de composés phénoliques fongitoxiques.

La part que prend l'induction de la résistance dans la protection globale de la plante par un agent de lutte biologique semble limitée lorsqu'elle est quantifiée.

#### 5.5.4. Traçage et écologie des agents de lutte biologique

Le traçage permet d'étudier la dispersion et le développement des agents antagonistes dans l'environnement ou sur ses cibles. Il permet d'estimer l'adaptation et la survie de l'agent de biocontrôle selon les méthodes d'application ou les formulations utilisées. De plus, le traçage est une exigence pour la procédure d'homologation. Il se compose de deux parties : l'identification et la quantification de l'agent.

#### 5.5.5. Application pratique

(Jijakli, 2003).

La mise en pratique de la lutte biologique rencontre quelques difficultés. Généralement, la protection offerte par l'emploi seul des antagonistes est insuffisante et il est donc nécessaire de chercher à augmenter l'efficacité des souches sélectionnées. Une autre difficulté rencontrée est le manque de compétitivité économique des agents de lutte biologique par rapport aux produits chimiques. Les tentatives d'application de la lutte biologique devraient cibler préférentiellement les problèmes pour lesquels les autres méthodes de lutte rencontrent des difficultés.

#### 5.5.6. Amélioration du système de biocontrôle

Pour améliorer le biocontrôle et rendre le BCA efficace sous une large gamme de conditions et contre un grand nombre de pathogènes, Janisiewicz et Korsten (2002) proposent trois voies de recherche :

1. l'amélioration de l'environnement nutritionnel : cela consiste à favoriser les conditions de développement de l'antagoniste. Pour cette raison, l'utilisation de substances stimulant l'activité antagoniste est très fréquente dans les formulations,
2. le mélange d'antagonistes : permet de maintenir ou d'améliorer les niveaux de protection dans des conditions environnementales très différentes. Le plus souvent un antagoniste a un spectre d'action réduit à un ou quelques pathogènes, ce qui représente un avantage pour la nature en protégeant la faune naturelle, mais un inconvénient pour le rendement des traitements. L'utilisation de mélanges d'agents de biocontrôle donne généralement une protection plus élevée comparée à des traitements avec un seul agent de biocontrôle. La combinaison des mécanismes d'action pourrait être à l'origine de cette meilleure efficacité vis-à-vis du pathogène (Leibniger *et al.*, 1997),

3. l'amélioration intrinsèque de l'antagoniste : en développant les aptitudes de l'agent antagoniste à s'adapter à son environnement ou en améliorant les caractéristiques propres de cet agent à l'aide de la technologie de l'ADN recombinant.

## Chapitre 6 : Les levures

### 6.1. Classification et caractéristiques générales

Les levures font partie des champignons unicellulaires. Elles sont classées sous le phylum des Basidiomycota ou Ascomycota, se reproduisent par bourgeonnement ou par fission et ont un stade sexuel sans nécessité de formation de corps de fructifications. Outre l'existence ou non d'une phase sexuelle, les critères de classification se basent également sur les caractéristiques morphologiques, biochimiques et génétiques des levures (Walker, 1998).

Les levures sont des organismes très répandus dans les écosystèmes naturels. Ce sont des micro-organismes non photosynthétiques dont les sources principales de carbone sont les sucres simples, les polyols, les acides organiques, les acides gras, les alcools aliphatiques, les hydrocarbures et quelques composés hétérocycliques et polymères. Selon la niche écologique, chaque levure est capable d'utiliser des sources très diverses de carbone montrant ainsi la grande spécificité d'adaptation de chaque levure par rapport à son milieu (Walker, 1998).

### 6.2. Sélection de deux levures : *Pichia anomala* souche K et *Candida oleophila* souche O

#### 6.2.1. Généralités

L'Unité de Phytopathologie de la FUSAGx travaille activement, depuis plusieurs années, à la mise au point d'une méthode de lutte biologique à base de levures contre les maladies de conservation des pommes et des poires. Dans ce cadre, *Pichia anomala* (souche K) et *Candida oleophila* (souche O) ont été retenues pour leur protection élevée (> 90%) et stable aussi bien à 5°C qu'à 25°C, contre *B. cinerea* et *P. expansum*, à partir d'un criblage *in vivo* de 329 micro-organismes (levures et bactéries) isolés de la surface des pommes Golden Delicious (Jijakli *et al.*, 1993).

Ces deux levures permettent une réduction significative des nécroses causées par *B. cinerea* et *P. expansum* et ce, même lorsqu'elles sont appliquées simultanément. La protection est toutefois supérieure quand les levures sont appliquées 24 heures avant les pathogènes.

Le traitement par 50 µl d'une suspension de levure de  $10^7$  ufc/ml est suffisant pour inhiber le développement de 50 µl à  $10^6$  spores/ml du champignon sur fruit à 5°C comme à 25°C (Jijakli *et al.*, 1999).

*P. anomala* et *C. oleophila* ont été testées pour leurs propriétés technologiques. Elles ont été produites en fermenteur par le Centre Wallon de Bio-Industrie (Gembloux, Belgique) et les produits de fermentation séchés par lyophilisation ont gardé leur activité protectrice (Jijakli *et al.*, 1993).

### 6.2.2. *Candida oléophila* souche O

C'est une levure de type anamorphique. Elle appartient à la subdivision des *Ascomycota* et à la famille des *Saccharomycetaceae*. Dans un premier temps, la souche O a été identifiée comme appartenant à l'espèce *Debaryomyces hansenii*, mais des tests récents ont déterminé que la souche O appartenait à *Candida oleophila* Montrocher. La figure 23 illustre des colonies de *Candida* sp.

Une souche de cette espèce (I-182) est déjà commercialisée aux Etats-Unis et en Israël sous le nom de Aspire mais les analyses génétiques menées à l'Unité de Phytopathologie ont confirmé la différence entre la souche O et la souche I-182.

### 6.2.3. *Pichia anomala* souche K

C'est une levure de type téléomorphique. Elle appartient à la subdivision des *Ascomycota* et à la famille des *Endomycetaceae*.

Elle peut se multiplier par bourgeonnement des cellules diploïdes ou haploïdes. Les cellules diploïdes peuvent former des asques comprenant chacune de 1 à 4 ascospores en forme de chapeau. Les ascospores haploïdes peuvent se conjuguer avec une ascospore du type opposé pour reconstituer l'état diploïde (Friel, 2001).

### 6.2.4. Mode d'action

Leur mode d'action a été étudié et il semble que leur antagonisme se marque à deux niveaux. En effet, les études semblent indiquer que la colonisation rapide des sites de blessures par les levures est décisive dans l'effet de protection. Cela suggère que l'antagonisme se situe en partie au niveau de la compétition pour les nutriments. Cependant, la germination *in situ* des spores de *B. cinerea* est réduite même lorsque le pathogène est appliqué simultanément aux levures. On peut donc penser que d'autres facteurs interviennent dans le processus de biocontrôle (Jijakli, 1996).

De plus, la production de  $\beta$ -1,3-glucanases, enzymes hydrolytiques dégradant les parois cellulaires des pathogènes, a été détectée dans des filtrats de cultures des levures. Cette présence a été corrélée avec une augmentation de la protection du fruit ce qui laisse supposer qu'elle participe au biocontrôle sur pommes.

Les  $\beta$ -1,3-glucanases sont impliquées dans la digestion des  $\beta$ -1,3-glucanes (constituant les parois fongiques) et la lyse des cellules des pathogènes. Elles contribuent également à la reconnaissance des pathogènes en libérant de petits fragments glucidiques à partir des parois fongiques. Ces oligosides peuvent agir comme éliciteurs et stimuler les réactions de défense de la plante-hôte.

Les niveaux d'activités endo- et exo- $\beta$ -1,3-glucanase de *P. anomala* étant plus élevés que ceux de *C. oleophila*, la suite des travaux concernant la mise en évidence du rôle de ces enzymes s'est effectuée à partir de filtrats de cultures de *P. anomala* souche K.

L'hypothèse d'un rôle de ces enzymes hydrolytiques dans la relation antagoniste a été analysée par une approche moléculaire visant à la disruption des gènes codant pour les exo- $\beta$ -1,3-glucanases (Grevesse *et al.*, 2003 cité par Massart et Jijakli, 2003). Deux gènes codant pour des exo- $\beta$ -1,3-glucanases ont été isolés à partir d'une banque génomique de *P. anomala* souche K. L'analyse des propriétés biologiques de souches mutantes, dont l'un des deux gènes responsables de l'activité exo- $\beta$ -1,3-glucanase a été disrupté, semble montrer que chacune des deux exo- $\beta$ -1,3-glucanases ne joue pas seule un rôle majeur dans l'activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea* (Massart et Jijakli, 2003).

Une étude plus approfondie a été entamée afin d'identifier les gènes impliqués dans le biocontrôle et de mieux comprendre leur régulation. A plus long terme, la connaissance de ces mécanismes permettra une sélection rationnelle d'une deuxième génération de souches de levures plus efficace (Massart et Jijakli, 2003).

Des composés stimulant la protection ont été étudiés en vue de réussir une formulation permettant une meilleure activité des deux souches contre l'ensemble des maladies post-récolte. Ainsi, l'utilisation de la souche K en mélange avec des  $\beta$ -1,3-glucanes et du  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  permet d'obtenir une efficacité supérieure et une durée d'action plus longue que la souche seule (Dickburt *et al.*, 2001). Le même effet peut être observé avec la souche O.

## **Chapitre 7 : Contexte économique de la banane guadeloupéenne**

(Loeillet, 1998)

Avec une production mondiale annuelle de 95 millions de tonnes, la banane se situe au deuxième rang, derrière l'orange, de la production mondiale de fruits, et est au cœur d'une guerre commerciale. D'un côté, il y a les multinationales américaines soutenues par Washington, de l'autre une Union Européenne de moins en moins apte à défendre une politique communautaire minée par les intérêts divergents de ses membres et partenaires.

Jusqu'en 1993, les « bananes dollars » étaient importées sans frais de douane à travers les filières intégrées des sociétés américaines qui en contrôlent la production, le transport et le mûrissage jusqu'à la distribution. Cette exonération de droits permit aux dites entreprises de réaliser des bénéfices colossaux, le fruit étant produit à très bas prix en Amérique Latine.

Effective depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1993, l'Organisation Commune de Marché de la banane (OCM), créée dans le cadre de la mise en place du marché unique européen, a institué un régime d'aides compensatoires destiné à assurer un revenu minimum aux producteurs européens. Mais la commission dut immédiatement faire face à une double pression : celle des multinationales américaines (qui se sont appuyées sur les pays producteurs d'Amérique Latine) et celle du front de refus des principaux importateurs de « bananes dollars » : Allemagne et Bénélux.

En avril 1994, l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) est créée en remplacement du GATT et dénonce rapidement le principe des quotas spécifiques mis en place par l'Union Européenne. En effet, le marché européen, l'un des plus importants et des plus rentables, absorbe chaque année 3,9 millions de tonnes de manière contingentée: 850 000 tonnes de production communautaire en provenance des îles dont 150 000 tonnes de Guadeloupe, 857 000 tonnes venant des pays ACP sans frais de douane et 2,2 millions de tonnes des pays d'Amérique Latine, dont les bananes dites « bananes dollars ». Ces dernières sont commercialisées par des firmes principalement américaines et sont soumises aux droits de douane. L'OCM privilégie ainsi les bananes communautaires et les bananes des pays ACP par un système de prix garanti et d'aides compensatoires.

Ce système est jugé discriminatoire et non conforme aux règles du commerce international par l'OMC. Aussi, malgré une première modification de l'OCM, le 1<sup>er</sup> janvier 1999 sous la pression des producteurs de « bananes dollars » et une diminution consécutive des droits de douane pour ces pays, le nouveau régime européen d'importation est à nouveau dénoncé par l'OMC qui conteste, en particulier, le principe des quotas spécifiques.

Ainsi, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2006, la protection communautaire et celle des pays ACP ne serait plus assurée que par les droits de douane. A partir de cette date, la concurrence avec les « bananes dollars » risque donc de s'accroître et les prix payés aux producteurs pourraient diminuer.

Dans ce contexte de globalisation du marché, la compétitivité de la banane d'exportation sera un des éléments clés de la viabilité économique des exploitants bananiers de Guadeloupe.

De plus, la qualité de la banane antillaise souffre d'une mauvaise réputation. Celle-ci est conséquente aux accidents de maturation et aux maladies de conservation telles les pourritures de couronne qui se développent fréquemment. Pour limiter le problème lié aux champignons, les fruits sont traités avec des fongicides avant d'être conditionnés.

Le programme qualité du CIRAD-FLHOR espère pouvoir diminuer et supprimer les traitements fongicides post-récolte afin de créer un label de qualité : « Sans traitement fongicide après récolte ». Il envisage ainsi d'exploiter un créneau commercial peu développé en production bananière et d'offrir aux consommateurs toujours plus soucieux de la santé et du respect de l'environnement, une banane antillaise labellisée qui garderait sa compétitivité dans le futur marché de la banane.

## **Objectifs**

L'activité protectrice élevée de deux souches de levures développées par l'Unité de Phytopathologie contre des pathogènes de conservation sur pommes et sur poires ayant déjà été mise en évidence, l'utilisation de ces souches pourrait être une alternative attrayante aux fongicides pour lutter contre les problèmes de pourritures de couronne rencontrés dans toutes les zones de production de bananes d'exportation.

Le but de cette étude a donc été d'évaluer l'activité antagoniste de deux souches de levures contre le complexe parasitaire responsable des pourritures de couronne et de déterminer certains facteurs influençant le niveau de protection.

L'influence du temps séparant l'application des levures de celle du pathogène a été le premier paramètre étudié.

La possibilité d'intégrer l'emploi des souches de levures à d'autres techniques de lutte comme l'emballage des bouquets de bananes dans des polybags a également été évaluée.

Cette étude avait donc pour but de chiffrer l'efficacité de l'activité protectrice des deux souches de levures dans un autre type de relation « hôte-pathogène » que celui étudié jusqu'à présent par l'Unité de Phytopathologie. Cette étude s'intègre parfaitement dans le programme qualité du CIRAD-FLHOR qui recherche des alternatives aux produits fongicides dans le but de créer une banane labellisée.

## Chapitre 1 : Choix des espèces fongiques étudiées

Le nombre de champignons impliqués dans le complexe et testés a été limité à trois pour permettre de balayer une quantité représentative d'agents responsables de la maladie tout en étant compatible avec le temps et le budget alloué à cette expérience. Le choix des champignons étudiés a été opéré au départ des données bibliographiques sur les différentes espèces fongiques principales isolées à partir des pourritures de couronne, dans les différentes zones de production et en fonction des espèces rencontrées sur la station de Neufchâteau.

Les parasites fongiques retenus étaient :

- *Colletotrichum musae* souche 46.12
- *Fusarium moniliforme* souche 7B
- *Cephalosporium* sp. souche 4B

Ces différentes souches avaient été isolées sur des couronnes contaminées et avaient déjà été utilisées pour plusieurs expériences au sein de la station du CIRAD-FLHOR. Elles sont conservées dans leur mycothèque à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une solution de glycérol (50%).

## Chapitre 2 : Souches de levures utilisées

Deux levures ont été testées:

- *Candida oleophila* souche O
- *Pichia anomala* souche K

Toutes deux ont été isolées par l'Unité de Phytopathologie de Gembloux (FUSAGx)

Elles ont été conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  sous forme de cellules dans une solution de glycérol (50%) pour une conservation de longue durée.

## Chapitre 3 : Matériel végétal et échantillonnage

Le matériel végétal utilisé (triploïde *acuminata*) appartient au cultivar Grande-Naine du sous-groupe Cavendish.

Les échantillonnages ont été effectués sur le site d'emballage de la station expérimentale du CIRAD-FLHOR, du domaine de Neufchâteau à Capesterre en Guadeloupe. Ce site est localisé sur la côte au vent de Basse-Terre à une altitude moyenne de 250m. Les

mains ont été récupérées le matin même de l'expérimentation. Les bananes ont été récoltées à l'intervalle fleur-coupe (IFC) de 900°C jour au seuil de 14°C afin d'homogénéiser le stade physiologique à la récolte. Elles ont toutes été prélevées sur des secondes et troisièmes mains caractérisées par :

1. un nombre de fruits par mains supérieur à 20,
2. des grades et des longueurs de doigts équivalents,
3. l'absence de fruits non-conformes,
4. un ensemble de fruits sans défaut observable,
5. issus de régimes semblables,

Les mains ont été découpées en bouquets de 4 doigts. Le bouquet a constitué l'unité expérimentale et chaque modalité d'une expérience était constituée de 5 bouquets. Les 5 bouquets d'une modalité étaient issus de 5 régimes différents et les 5 bouquets de chaque modalité étaient prélevés sur les 5 mêmes régimes.

Chaque expérimentation a été répétée 6 fois dans le temps.

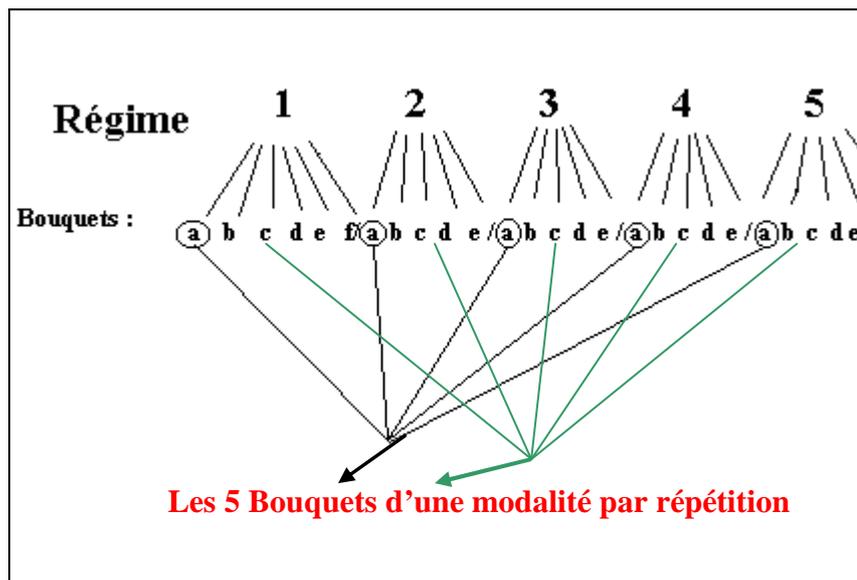


Fig.24 : Représentation schématique de l'échantillonnage effectué.

## Chapitre 4 : Nature des objets témoins

Pour chaque expérience, deux modalités témoins ont servi de comparaison. D'une part la modalité « témoins non traités » et d'autre part la modalité « témoins fongicides ». Les bouquets faisant partie de la modalité « témoins non traités » ont été inoculés avec les mêmes pathogènes que les autres modalités mais n'ont subi aucun traitement ultérieur. Par contre, les

bouquets des groupes « témoins fongicides » ont été trempés une minute dans du thiabendazole à la dose de 500mg/L (Mertect 20S) après leur inoculation par les pathogènes.

## **Chapitre 5 : Méthode de reproduction des symptômes**

La méthode avait été mise au point, testée et validée par le CIRAD-FLHOR dans le cadre du programme qualité de la banane en post-récolte. Les couronnes des bananes ont été inoculées artificiellement par les pathogènes impliqués dans la maladie post-récolte et ont subi les conditions imitant l'exportation industrielle.

### **5.1. Préparation des pathogènes**

*Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme* et *Cephalosporium sp.*, ont été repiqués sur milieu PDA et conservés à 25°C pendant 7 à 10 jours avant leur mise en suspension dans 10 ml d'eau distillée stérile. Les cultures ont ensuite été raclées avec un étaleur coudé afin de récupérer les spores. La suspension a été passée sur un filtre de type Wattman 40 µm. La concentration initiale en spores a été déterminée, après agitation, par comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez. Une fois la concentration initiale déterminée, la concentration finale a été obtenue par dilutions successives en prenant soin de vortexer les suspensions entre chaque dilution.

Les concentrations finales attendues étaient de 10<sup>3</sup> conidies/ml pour *Colletotrichum musae*, et de 10<sup>4</sup> conidies/ml pour *Fusarium moniliforme* et *Cephalosporium sp.*

Pour le complexe, un mélange des trois champignons aux mêmes concentrations a été réalisé.

### **5.2. Préparation des couronnes**

Les mains de bananes, récupérées le jour même de l'expérience à la station selon l'échantillonnage prévu, ont été ramenées au laboratoire. Elles ont été découpées en bouquets de 4 doigts sans défaut. Les doigts des extrémités des mains ont été systématiquement éliminés. Chaque bouquet a alors été marqué selon son régime d'origine et sa modalité de destination.

Les bouquets ont été placés sous l'eau courante pendant au moins 20 minutes afin de permettre l'écoulement du latex.

Les couronnes ont été rafraîchies au couteau pour supprimer les tissus desséchés. Ces coupes étaient de sections carrées, régulières et nettes pour permettre d'obtenir des couronnes similaires entre les bouquets (Fig.25a).

Enfin, les couronnes ont été désinfectées en les trempant 10 secondes dans de l'alcool à 90° dilué à 50%.

### **5.3. Inoculation des couronnes**

Une fois les couronnes sèches, elles ont été inoculées avec la suspension du pathogène ou du complexe préparée au point 5.1. Cette inoculation a été réalisée par dépôt de 100 µl de la suspension au niveau de la couronne (Fig.25b). La suspension a été agitée systématiquement après chaque dépôt. Un carré de papier filtre stérilisé a été déposé sur la goutte afin d'éviter l'écoulement de celle-ci et de maintenir l'inoculum sur la couronne (Fig.25c).

### **5.4. Simulation du programme d'exportation**

Après inoculation, les bananes ont été emballées par modalité dans des polyfilms perforés et placées dans des cartons d'exportation de petit format (Fig.25d). La simulation du transport en bateau a été effectuée par un stockage des bananes en chambre tempérée à 13°C durant 10 jours (Fig.26a).

Ce laps de temps écoulé, les cartons et les polyfilms ont été ouverts afin que les bananes soient exposées à un traitement à l'azétylène à 1000 ppm à 20°C durant 24 heures dans des caissons de gazage spécifiques (Fig.26b et 26c). Après ces 24 heures, les cartons ont été refermés et placés dans une autre chambre thermorégulée à 20°C jusqu'à atteindre le stade « tournant jaune », c'est-à-dire 3 jours après le traitement à l'azétylène.

### **5.5. Evaluation de la progression des pathogènes**

Deux évaluations de la progression des pathogènes ont été effectuées durant la simulation du programme d'exportation. La première était effectuée après les dix jours en chambre à 13°C, ce qui correspondait à l'entrée des bananes en mûrisserie. Il s'agissait d'une « Evaluation de la Surface externe de la Couronne Colonisée » par les pathogènes et a été

renseignée par les initiales « ESCC » dans l'analyse des résultats. A la suite d'observations visuelles, elle consistait à classer les couronnes, selon le pourcentage de surface qui avait été colonisée par le pathogène, de la façon suivante (Fig.27a) :

- Classe 0 : Pas de symptôme externe,
- Classe 1 : de 0 à 25 % de la surface de la couronne colonisée,
- Classe 2 : de 25 à 50 % de la surface de la couronne colonisée,
- Classe 3 : de 50 à 75 % de la surface de la couronne colonisée,
- Classe 4 : de 75 à 100 % de la surface de la couronne colonisée.

La deuxième évaluation était effectuée au stade « sortie mûrissérie », trois jours après le traitement à l'azéthylène, et a permis de chiffrer la progression interne des champignons au sein de la couronne. Cette évaluation a permis d'obtenir un « Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée » qui a été appelé « PSCN » dans l'analyse des résultats. Pour procéder à cette évaluation, les bouquets de 4 doigts ont été séparés en deux bouquets de deux doigts. La découpe transversale de la couronne a permis une visualisation des nécroses internes. La mesure de la surface de nécrose exprimée en mm<sup>2</sup> a été reportée à la surface totale de la couronne afin d'être exprimée en pourcentage de surface interne de couronne nécrosée (Fig.27b).

L'efficacité des souches de levures a également été exprimée en pourcentage de protection par rapport au témoin non traité. Ce pourcentage a été établi en se basant sur les résultats du PSCN. Les valeurs des pourcentages de protection par répétition ainsi que les moyennes et écarts types de ces pourcentages par essai sont en annexe 7.

$$\text{Pourcentage de protection par rapport au témoin} = \left( \frac{\text{PSCN (T)} - \text{PSCN (O)}}{\text{PSCN (T)}} \right) * 100$$

PSCN (T) = PSCN moyen chez le lot témoin non traité

PSCN (O) = PSCN moyen chez l'objet étudié

La différence moyenne du PSCN entre deux traitements ainsi que les limites de confiance de cette moyenne ont été calculées à l'aide de la formule suivante (Dagnelie, 1994):

$$= (x_1 - x_2) \pm t_{(1 - \alpha/2)} \sqrt{CMr \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Avec :  $x_1$  = Moyenne du PSCN du traitement 1

$x_2$  = Moyenne du PSCN du traitement 2

$t_{(1 - \alpha/2)}$  = Coefficient  $t$  de student pour un risque  $\alpha$  de 0,05.

$CMr$  = Carré moyen résiduel

$n_1$  = Effectif dans groupe 1

$n_2$  = Effectif dans groupe 2

## Chapitre 6 : Préparation et application des suspensions de levures

### 6.1. Préparation des suspensions de levures

Les souches de levures ont été mises en culture sur boîtes de Petri contenant le milieu PDA et maintenues dans une chambre de culture à 4°C.

Les levures ont été repiquées trois fois à 24 heures d'intervalle sur milieu PDA avant d'être utilisées pour préparer la suspension. Entre les repiquages, elles ont été conservées à 20°C. Vingt ml de solution isotonique (NaCl 8,5g/l) autoclavée ont été déposés par boîte de Petri. Les levures ont été récupérées grâce à un étaleur coudé stérile et transférées dans une bouteille de 200 ml à l'aide d'une micro-pipette.

La concentration en ufc/ml a été déterminée par comptages à l'aide d'une cellule de Mallassez. La concentration initiale déterminée, la concentration finale a été obtenue par dilution avec de l'eau isotonique préalablement autoclavée. Entre chaque dilution la suspension a été soigneusement agitée pour l'homogénéiser. Le volume final devait être proche du litre de suspension.

## 6.2. Application des levures sur les couronnes

Les suspensions d'un litre de levures préparées au point 6.1. ont été transférées dans des bassines d'un litre, permettant un trempage des couronnes pendant dix secondes (Fig.28). Les suspensions étaient en agitation constante grâce à l'utilisation d'un agitateur à puce magnétique.

Les couronnes ainsi traitées ont été mises à sécher avant d'être emballées par modalité dans des polyfilms perforés et placées dans des cartons pour subir la simulation du programme d'exportation.

## Chapitre 7 : Essais réalisés

### 7.1. Evaluation de l'efficacité de deux souches de levures vis-à-vis de trois agents fongiques impliqués dans la maladie

Les trois parasites ont été inoculés seuls ou en mélange sur les couronnes. Trois heures plus tard, chaque souche de levures à des concentrations de  $10^6$  à  $10^8$  ufc/ml a été appliquée. Ainsi, par pathogène et pour le complexe, huit modalités de cinq bouquets ont été testées :

- A : Fruits inoculés non traités,
- B : Fruits inoculés et traités au thiabendazole (Mertect 20 S),
- C : Fruits inoculés et traités avec la souche K à  $10^6$  ufc/ml,
- D : Fruits inoculés et traités avec la souche O à  $10^6$  ufc/ml,
- E : Fruits inoculés et traités avec la souche K à  $10^7$  ufc/ml,
- F : Fruits inoculés et traités avec la souche O à  $10^7$  ufc/ml,
- G : Fruits inoculés et traités avec la souche K à  $10^8$  ufc/ml,
- H : Fruits inoculés et traités avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml.

Ceci a constitué une expérimentation. Chaque expérimentation a été répétée 6 fois dans le temps.

## **7.2. Evaluation de l'efficacité de la souche O vis-à-vis des pourritures de couronne en fonction du temps séparant l'application de la levure de celle du complexe**

La souche O à  $10^8$  ufc/ml a été appliquée sur des couronnes 24h avant, 15 minutes après et 3h après leur inoculation avec le complexe parasitaire artificiel.

Chaque expérimentation était constituée de 5 modalités comprenant chacune 5 bouquets :

- A. Témoin : complexe non traité,
- B. Traitement fongicide,
- C. Application des levures 15 minutes après l'inoculation du complexe,
- D. Application des levures 3 heures après l'inoculation du complexe,
- E. Application des levures 24 heures avant l'inoculation du complexe.

Six répétitions dans le temps ont été effectuées.

## **7.3. Evaluation de l'efficacité de la souche O en combinaison avec l'utilisation de polybags de 50 $\mu$ m vis-à-vis des pourritures de couronnes.**

La souche O à  $10^8$  ufc/ml a été appliquée sur des bouquets 3h après leur inoculation par le complexe.

Chaque expérimentation comprenait 4 modalités de dix bouquets.

- A. Témoin : complexe non traité,
- B. Traitement fongicide,
- C. Application de la levure O à  $10^8$  ufc/ml 3 heures après l'inoculation des couronnes par le complexe,
- D. Application de la levure O à  $10^8$  ufc/ml 3 heures après l'inoculation des couronnes par le complexe et emballage des bouquets dans un polybag de 50  $\mu$ m.

Dès que les bananes de la modalité D ont été emballées dans le polybag, celui-ci a été fermé par un nœud pour permettre l'installation d'une atmosphère modifiée. Les autres modalités ont été emballées dans un polyfilm classique.

Chaque modalité a été placée dans des grands cartons à bananes de 18,5 kg afin de subir le programme d'exportation.

Six répétitions dans le temps ont été effectuées

## **Chapitre 8 : Méthode d'analyse**

### **8.1. Conditions d'application**

La normalité des populations n'a pas pu être vérifiée puisque l'unité expérimentale était constituée d'un seul bouquet. Cependant, une droite de Henry des valeurs résiduelles et un histogramme de ces valeurs ont été réalisés pour chacune des expérimentations afin de vérifier la normalité des populations à posteriori. Ces droites sont présentées en annexe 1 et les histogrammes en annexe 2.

### **8.2. Type d'analyses**

Les résultats de chacune des deux évaluations des trois essais ont été soumis à une analyse de la variance à trois critères de classification, partiellement hiérarchisée et mixte. Les deux facteurs aléatoires étaient : les répétitions et les régimes avec respectivement 6 et 5 niveaux. Le troisième facteur était fixe : il s'agissait des traitements et le nombre d'objets était différent d'un essai à l'autre en fonction des types de traitements comparés.

Les tableaux de l'analyse de la variance de l'ESCC et du PSCN sont respectivement mis en annexes 3 et 4 de ce travail.

### **8.3. Remarque relative à l'analyse des données concernant les traitements fongicides**

Les valeurs des deux évaluations de chaque expérience concernant les bouquets traités avec le fongicide étant nettement différentes des valeurs des autres traitements, la modalité « traitement fongicide » n'a pas été prise en considération dans les analyses de la variance.

### **8.4. Logiciels utilisés**

Les analyses de la variance ont été réalisées pour les deux types d'évaluation à l'aide du logiciel MINITAB développé par Minitab. Elles ont été suivies des tests de Newman et Keuls effectués par le logiciel SAS, au seuil de 5% pour l'ensemble des variables mesurées au cours de ces expérimentations. Les tableaux des tests de Newman et Keuls sont en annexe 5 pour l'ESCC et en annexe 6 pour le PSCN.

## **Chapitre 1 : Introduction**

La maladie de la pourriture de couronne est un complexe variable de plusieurs pathogènes. Cependant, afin de faciliter la réalisation des essais, seuls trois champignons ont été sélectionnés pour effectuer les différents tests. Ces trois champignons, parmi les plus importants identifiés, ont un rôle majeur dans le développement de la maladie et interviennent fréquemment dans la composition du complexe tel qu'on le rencontre dans les Antilles françaises.

Dans ce travail, trois essais d'efficacité de l'activité protectrice des deux souches de levures contre des champignons phytopathogènes ont été réalisés :

- Essais d'efficacité des deux souches de levures à trois concentrations différentes sur le contrôle du développement des champignons impliqués dans le complexe parasitaire et sur le complexe lui-même.
- Essais d'efficacité de la souche O à  $10^8$  ufc/ml sur le contrôle des pourritures de couronne en fonction du temps d'incubation s'écoulant entre l'application de la souche de levure et l'inoculation du complexe parasitaire.
- Essais d'efficacité de la souche O à  $10^8$  ufc/ml sur le contrôle des pourritures de couronne en combinaison avec l'utilisation de polybags de 50  $\mu$ m.

Aucune référence n'a été trouvée concernant les concentrations d'inoculum auxquelles sont exposées les couronnes dans la réalité. C'est pour cette raison que les concentrations en pathogènes ont été choisies sur base d'essais antérieurs déjà effectués sur cette maladie (Pacico, 2001). Sachant que *Colletotrichum musae* nécessite un plus faible niveau d'inoculum que les autres pour obtenir des symptômes, les concentrations ont été définies afin d'obtenir des niveaux de contaminations extrêmement sévères, rarement rencontrés dans la réalité.

## Chapitre 2 : Evaluation de l'efficacité de deux souches de levures vis-à-vis de trois agents fongiques impliqués dans la maladie

### 2.1. Généralités

La première étape de ce travail consistait à mettre en évidence et à chiffrer l'activité antagoniste des 2 souches de levures contre le complexe des pourritures de couronne de la banane et contre les trois champignons du complexe testés individuellement.

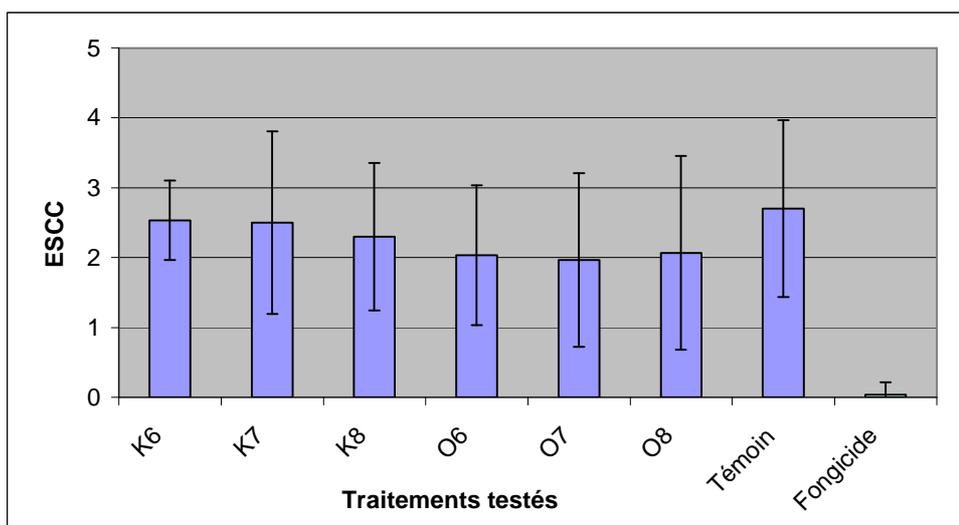
### 2.2. Bouquets inoculés avec *Colletotrichum musae*

L'évaluation de l'effet des souches de levures sur *C. musae* est particulièrement importante car ce champignon est le plus fréquemment rencontré et le plus pathogène parmi ceux impliqués dans le complexe parasitaire.

#### 2.2.1. Evaluation en entrée mûrissier (ESCC)

Les résultats de l'analyse de la variance ont indiqué qu'il n'y avait pas d'effet significatif ( $p = 0,176$ ) du traitement par les levures par rapport au témoin, sur le développement de *C. musae* à la surface de la couronne. Par contre, il existait un effet de la répétition ( $p < 0,0001$ ). Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme (Fig. 29).

Le traitement fongicide permet une diminution importante de la colonisation externe de la couronne.



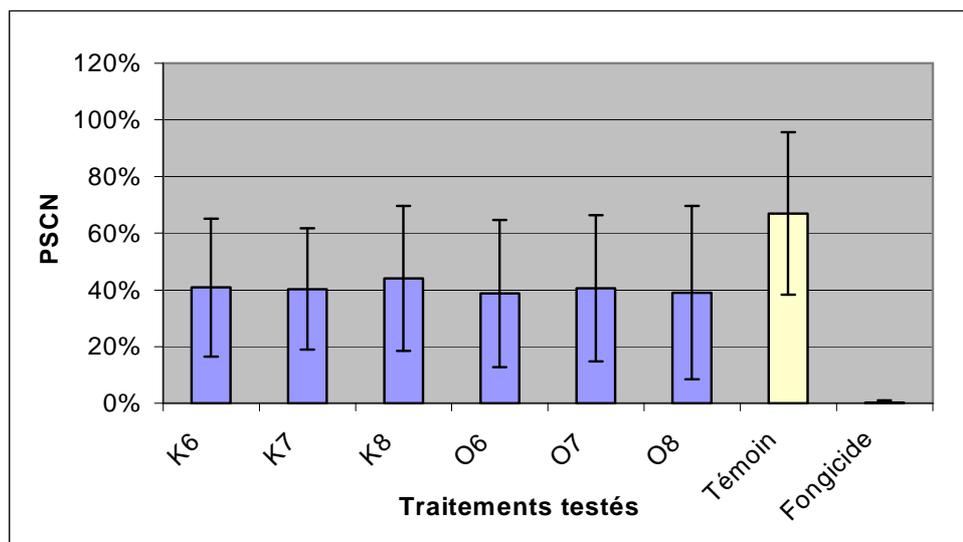
**Figure 29** : Moyennes et écarts types de l'ESCC (Evaluation de la Surface de Couronne Colonisée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après inoculation par *C. musae*. Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

### 2.2.2. Evaluation en sortie mûrissérie (PSCN)

L'analyse de la variance du PSCN des couronnes inoculées avec *C. musae* a permis de mettre en évidence l'existence d'au moins une différence très hautement significative ( $p < 0,0001$ ) entre les traitements. L'effet de la répétition est toujours présent ( $p < 0,0001$ ).

La comparaison des moyennes a révélé que cette différence se situait entre le témoin non traité et l'ensemble des traitements par les levures. Les différents traitements levures ne présentaient pas de différences significatives du PSCN entre eux. La figure 30 représente les PSCN des différents traitements. Avec un PSCN de 0%, le traitement fongicide était le plus efficace.

Le PSCN moyen pour la série regroupant l'ensemble des bouquets traités avec les levures était de 40,6% contre 67,0% pour le groupe témoin non traité. La différence de nécroses entre ces deux groupes était de 26,4% avec un intervalle de confiance, pour cette différence, compris entre 18,4 % et 34,4 %.



**Figure 30 :** Moyennes et écarts types du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après leur inoculation par *C. musae*.

Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

### 2.2.3. Discussion

Dans les deux types d'évaluations, il est apparu que, d'une part le traitement fongicide restait le moyen le plus efficace pour limiter les dégâts causés par *C. musae* et que, d'autre part, il y avait un effet de la répétition.

Alors que les résultats de la première évaluation ne permettaient pas de détecter la moindre action antagoniste des levures vis-à-vis de *C. musae*, l'analyse du PSCN a démontré l'existence d'une activité antagoniste des levures sur le pathogène. Comme celui-ci est généralement considéré comme le champignon le plus fréquemment rencontré et le plus pathogène de ceux impliqués dans le complexe, la détection d'un effet antagoniste envers *C. musae* est une découverte encourageante dans le développement d'une méthode de lutte biologique contre les pourritures de couronne.

Cet essai a permis d'établir que les effets antagonistes étaient similaires quelle qu'ait été la souche et la concentration en ufc/ml utilisées. Il semble donc que la gamme de concentrations testée était insuffisante pour *C. musae*. Il serait intéressant de déterminer la

concentration seuil inférieure permettant la même réduction des nécroses dues à *C. musae*. De même, il faudrait déterminer la concentration en antagoniste augmentant significativement le niveau de protection. Ceci s'avère important dans l'aspect économique du développement d'une telle lutte.

Le pourcentage de protection moyen par rapport au témoin offert par les levures contre *C. musae* est de 40,5%. Cependant, il faut rester prudent par rapport à cette valeur de protection en raison du manque de répétabilité de l'expérience et des écarts types élevés observés. Malgré cela, ce pourcentage est une première indication du potentiel antagoniste. De plus, ce pourcentage est similaire à ceux trouvés dans la littérature. Les levures testées contre *C. musae* par Postmaster *et al.*, (1997) sur des feuilles de bananier ont atteint un pourcentage de protection de 35%. De Costa (1998) obtient *in vivo* un pourcentage de protection contre *C. musae* de 39%.

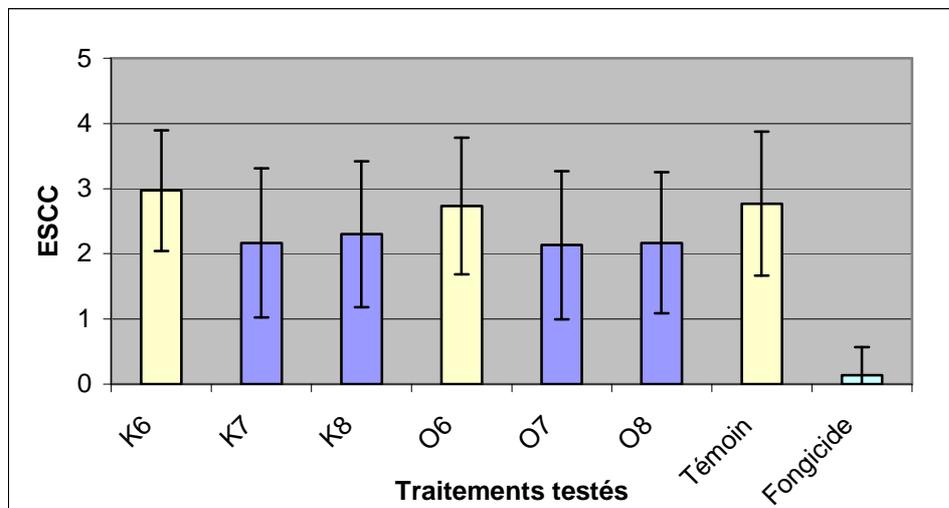
### 2.3. Bouquets inoculés avec *Fusarium moniliforme*

Le deuxième champignon sur lequel a été testée l'activité antagoniste des souches de levures était *F. moniliforme*. Il est également l'un des pathogènes les plus fréquemment rencontrés dans le complexe.

#### 2.3.1. Evaluation en entrée mûrissierie (ESSC)

L'analyse de la variance a mis en évidence une différence très hautement significative entre les traitements ( $p < 0,0001$ ) et entre les répétitions ( $p < 0,0001$ ).

La comparaison des moyennes a différencié deux groupes d'efficacité distincts qui sont représentés à la figure 31. La souche O et la souche K, toutes deux à une concentration de  $10^6$  ufc/ml, n'ont pas entraîné de réduction de la colonisation externe de la couronne par *F. moniliforme* par rapport au témoin non traité. Par contre, les autres combinaisons « souche de levure-concentration » ont permis une diminution similaire de la colonisation et significativement différente du témoin non traité.



**Figure 31** : Moyennes et écarts types de l'ESSC (Evaluation de la Surface de Couronne Colonisée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après inoculation par *F. moniliforme*. Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

### 2.3.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)

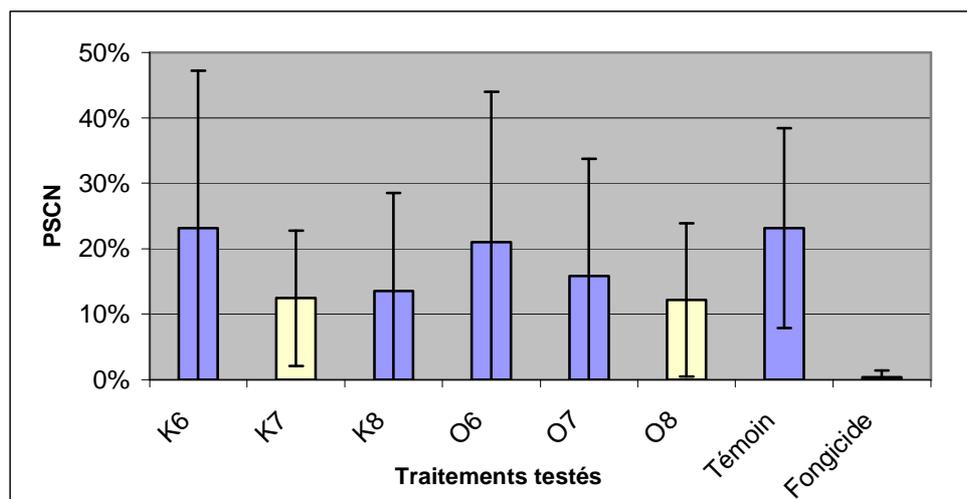
L'analyse de la variance a mis en évidence une différence significative entre les traitements ( $p = 0,0225$ ). Un effet très hautement significatif du facteur répétition ( $p < 0,0001$ ) a été observé.

Cependant, malgré ces résultats, le test de Newman et Keuls n'a pas permis de localiser les différences existant entre les traitements. Ce désaccord avec l'analyse de la variance précédemment effectuée est probablement dû à une différence de puissance des tests.

Exceptionnellement, un test de Dunnett a été effectué pour cette évaluation afin de pallier à ce problème et déceler les différences signalées par l'analyse de la variance. Ce test ne détecte que les traitements qui sont significativement différents du témoin.

Il en ressort, qu'à la différence des autres combinaisons « souche de levure-concentration », les bouquets traités avec la souche K à  $10^7$  ufc/ml et la souche O à  $10^8$  ufc/ml montraient une différence significative dans le PSCN par rapport au témoin non traité. Cette différence moyenne était de 12,3% de nécroses avec un intervalle de confiance compris entre 5,1% et 19,5%.

Les résultats de cette évaluation sont représentés sous forme d'histogramme (Fig.32). Le traitement fongicide a été le plus efficace.



**Figure 32:** Moyennes et écarts types du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après leur inoculation par *F. moniliforme*. Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

### 2.3.3. Discussion

Les résultats des deux évaluations ne sont identiques mais ils ne se contredisent pas. En effet, dans la première évaluation, 4 traitements sur 6 différaient du témoin et dans la deuxième, il n'y avait plus que deux de ces 4 traitements qui permettaient une réduction interne des nécroses. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la première évaluation est beaucoup moins objective et précise que la deuxième. En effet, l'ESCC se base sur une observation visuelle des symptômes et permet une classification à 5 niveaux, empêchant ainsi de petites différences de symptômes d'être reflétées. L'ESCC a donc permis de donner des informations sur une tendance constatée. A l'opposé, la mesure du PSCN en sortie mûrissier est plus représentative de la sensibilité des fruits à la maladie car il s'agit d'une variable quantitative mesurée avec précision. L'essentiel de la discussion a donc été basé sur les résultats du PSCN.

Seules les souches K appliquée à  $10^7$  ufc/ml et O appliquée à  $10^8$  ufc/ml ont permis une réduction significative des nécroses internes.

Les pourcentages de protection moyens par rapport au témoin fournis par les deux souches K à  $10^7$  UFC/ml et O à  $10^8$  UFC/ml sont respectivement de 46% et 48%.

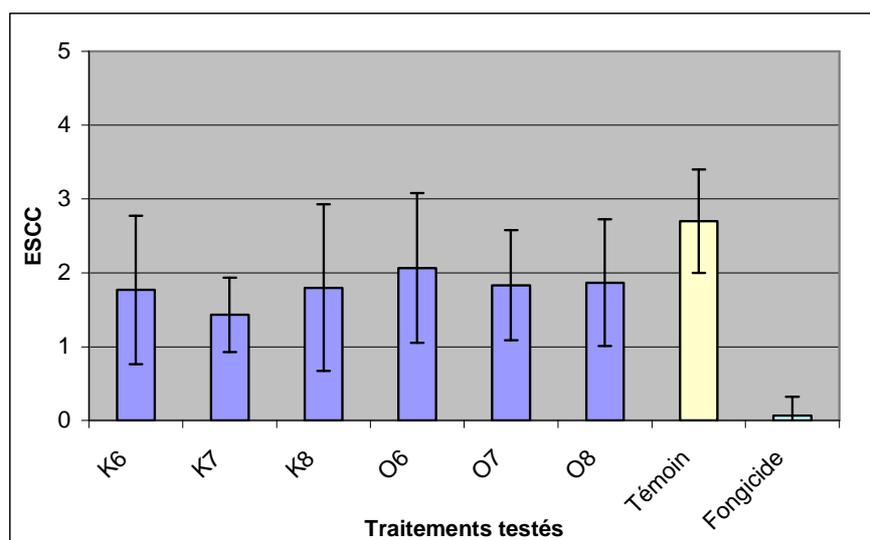
## 2.4. Bouquets inoculés avec *Cephalosporium sp.*

*Cephalosporium sp.* est le dernier pathogène du complexe sur lequel des essais pour détecter un effet antagoniste des levures ont été réalisés.

### 2.4.1. Evaluation en entrée mûrissierie (ESCC)

L'analyse a indiqué une différence hautement significative entre les traitements ( $p=0,007$ ) et une différence très hautement significative entre les répétitions ( $p<0,0001$ ).

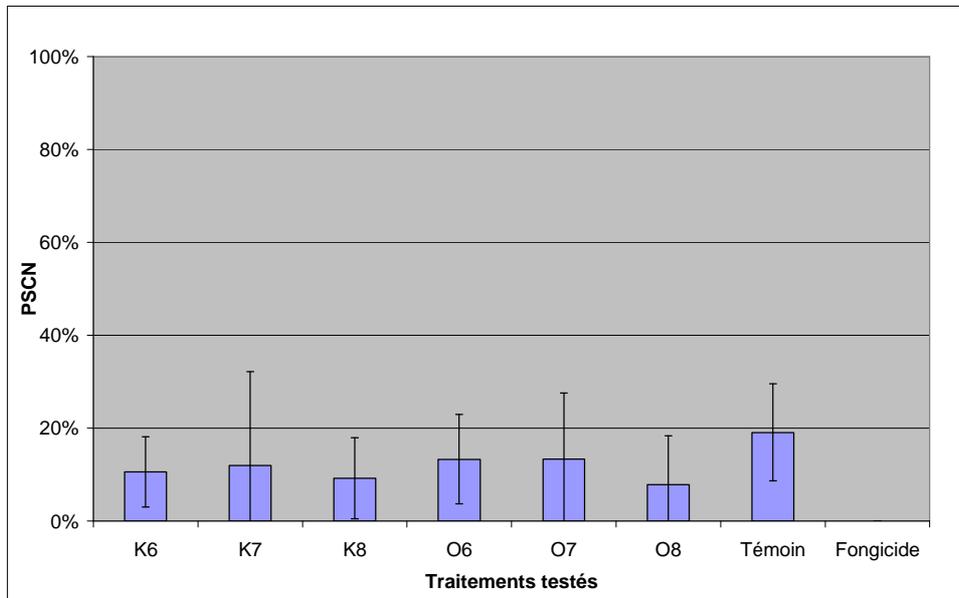
La comparaison des moyennes a mis en évidence que la différence se situait entre le témoin et l'ensemble des combinaisons « souche de levure-concentration » (Fig.33). Comme lors des essais précédents, le traitement fongicide a été le traitement le plus efficace.



**Figure 33 :** Moyennes et écarts types de l'ESCC (Evaluation de la Surface de Couronne Colonisée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après inoculation par *Cephalosporium sp.* Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

### 2.4.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)

L'analyse de la variance a conduit à accepter, d'une part l'hypothèse nulle de départ à savoir l'égalité des moyennes des modalités comparées, et d'autre part la répétabilité de l'expérience. La figure 34 illustre le PSCN qui a été observé pour chaque modalité.



**Figure 34 :** Moyennes et écarts types du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après inoculation par *Cephalosporium sp.* Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

### 2.4.3. Discussion

Bien que l'ESCC ait révélé un effet antagoniste des levures envers *Cephalosporium sp.*, l'analyse du PSCN, qui est plus objective, a démenti cette hypothèse.

Les deux souches de levures ne semblent pas avoir d'effet antagoniste sur *Cephalosporium sp.* Cependant, la valeur de p étant très proche de 0,05, il est raisonnable de supposer qu'il existe une différence mais que l'expérience n'a pu la mettre en évidence. D'autres essais devraient être effectués afin de confirmer cette absence d'activité antagoniste des deux souches de levures sur *Cephalosporium sp.*

Le PSCN pour les objets témoins non traités n'était que de 19% révélant la faible pathogénicité de *Cephalosporium sp.* par rapport à *C.musae*.

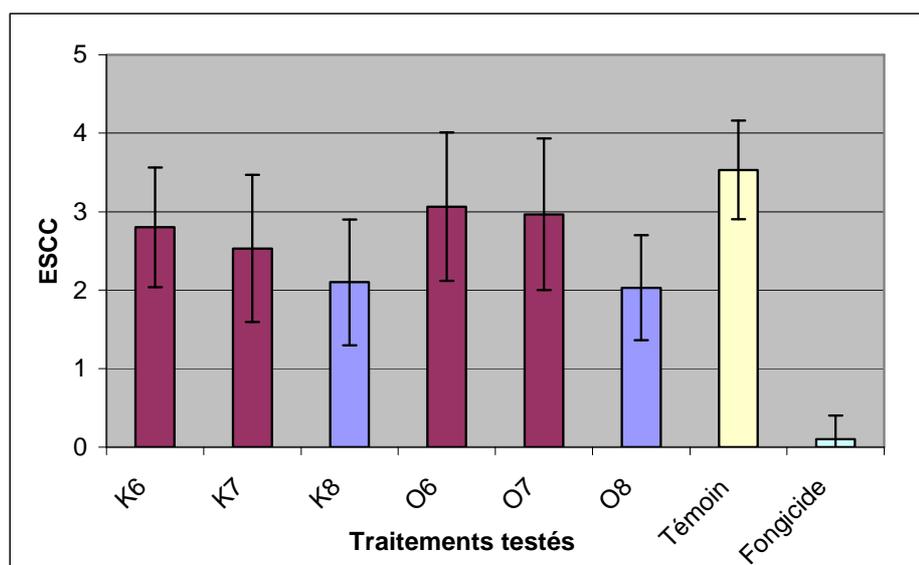
## 2.5. Bouquets inoculés avec le complexe

Le complexe était constitué d'un mélange des trois pathogènes aux mêmes concentrations respectives que celles qui ont été utilisées précédemment.

### 2.5.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)

L'analyse de la variance a mis en évidence une différence très hautement significative entre les traitements ( $p < 0,0001$ ) ainsi qu'entre les répétitions ( $p < 0,0001$ ).

Le test de Newman et Keuls a différencié trois groupes d'efficacité distincts (Fig. 35) Les traitements avec les souches K et O à une concentration de  $10^8$  ufc/ml présentaient la plus faible valeur de l'ESCC. Ils ont été suivis des autres combinaisons « souche de levure-concentration », puis du témoin qui présentait les valeurs de l'ESCC les plus élevées.



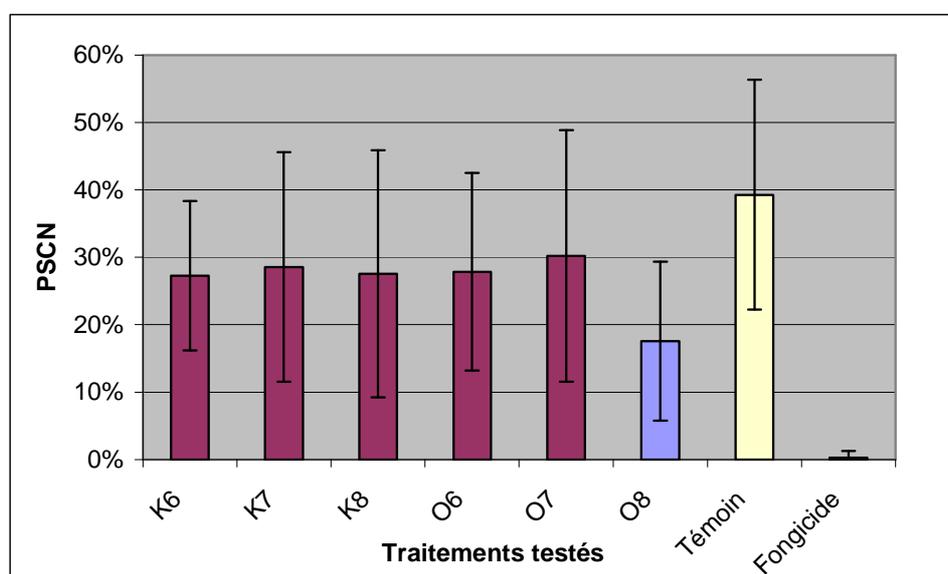
**Figure 35 :** Moyennes et écarts type de l'ESCC (Evaluation de la Surface de Couronne Colonisée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après inoculation par le complexe artificiel. Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

## 2.5.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)

L'analyse de la variance a rejeté de manière très hautement significative l'égalité des moyennes comparées ( $p < 0,0001$ ) tandis que la répétabilité des résultats a été acceptée ( $p = 0,0878$ ).

Le test de Newman et Keuls a mis en évidence trois groupes d'efficacité différents (Fig.36):

- Groupe A : Témoins non traités
- Groupe B : Bouquets inoculés avec K à  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  ufc/ml et O à  $10^6$  et  $10^7$  ufc/ml
- Groupe C : Bouquets inoculés avec O à  $10^8$  ufc/ml



**Figure 36 :** Moyennes et écarts types du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement appliqué aux couronnes après leur inoculation par le complexe parasitaire artificiel. Les données K6, K7, K8 correspondent aux traitements effectués par la souche K aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les données O6, O7, O8 correspondent aux traitements effectués par la souche O aux concentrations respectives de  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/ml. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés

De toutes les combinaisons « souche de levure-concentration » qui ont été testées, la souche O à une concentration de  $10^8$  ufc/ml a montré l'effet antagoniste le plus marqué envers le complexe. Les cinq autres combinaisons avaient un effet antagoniste relativement plus faible mais qui leur permettait toutefois de se différencier du témoin.

La différence moyenne du PSCN entre les groupes B et C était de 10,7% et l'intervalle de confiance de cette différence était compris entre 5,9% et 15,5%. La différence moyenne du PSCN entre les objets traités avec O à  $10^8$  ufc/ml et les objets témoins était de 21,7%, avec un intervalle de confiance compris entre 15,5% et 27,9%. Les bouquets traités avec le fongicide présentaient le moins de nécroses.

### 2.5.3. Discussion

Comme lors des essais avec les autres champignons, l'ESCC a donné une première tendance mais c'est en effectuant le calcul du PSCN que les traitements montrant la meilleure action antagoniste ont réellement été distingués et qu'il a été possible de chiffrer cette action.

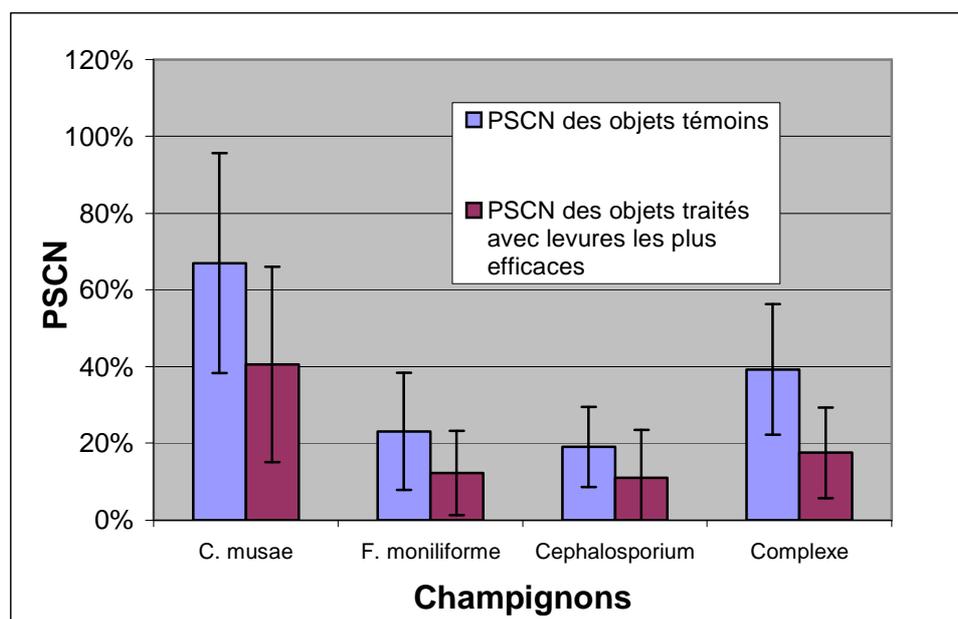
La souche O à  $10^8$  ufc/ml a montré l'activité protectrice la plus élevée vis-à-vis du complexe et a été sélectionnée pour la suite des expériences. Le pourcentage de protection par rapport au témoin est de 56% et est relativement bon comparé à ce qui peut être trouvé dans la littérature. De Costa (1998) obtient des pourcentages de protection *in vivo*, grâce à des bactéries, variant entre 30 et 42% pour les différents parasites du complexe testés individuellement. Le pourcentage de protection obtenu contre le complexe en particulier est de 42%. De plus, le protocole expérimental se rapproche fortement de celui utilisé dans ce travail. Toutefois, il faut se montrer prudent par rapport à ces comparaisons à cause de la grande variabilité observée tant au niveau de l'expression des symptômes qu'au niveau des pourcentages de protection.

Les figures 37 illustrent les niveaux du PSCN chez les bouquets témoins (37a), chez les bouquets traités avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml (37b) et chez les bouquets traités avec le fongicide (37c).

## 2.6. Discussion générale de l'essai

Les champignons n'avaient pas le même pouvoir pathogène aux concentrations de spores utilisées pour les inoculations. La figure 38 illustre cette différence. *C. musae* était le plus pathogène suivi de *F. moniliforme* et de *Cephalosporium* sp. Le complexe a présenté une pathogénicité intermédiaire. Il pourrait exister, entre les champignons, des phénomènes antagonistes qui induisent une réduction des nécroses dues à *C. musae*. Ainsi, le PSCN des bouquets témoins inoculés uniquement avec *C. musae* était de 67% contre 39% de couronnes nécrosées pour les témoins inoculés avec le complexe. D'autres interactions existent peut-être mais elles ne peuvent être déduites des résultats de cette expérience.

Il est également remarquable que les levures n'ont pas la même action antagoniste envers les différents pathogènes. En effet, les souches K et O avaient la même action envers *C. musae* et *F. moniliforme* alors qu'aucune des deux ne montrait un effet antagoniste contre *Cephalosporium* sp. et que la souche O à  $10^8$  ufc/ml présentait l'antagonisme le plus marqué contre le complexe.



**Figure 38 :** Pourcentages moyens de nécroses des objets témoins inoculés avec chaque pathogène et des objets traités avec les levures les plus efficaces pour chaque pathogène.

Les pourcentages de protection les plus élevés sont restés proches de 50%. Dans le cas de *C. musae*, il était de 40%. Pour *F. moniliforme*, les pourcentages de protection offerts par

la souche K à  $10^7$  ufc/ml et la souche O à  $10^8$  ufc/ml étaient, respectivement, de 46% et 48%. Ce pourcentage atteignait une valeur maximale de 56% vis-à-vis du complexe.

Ainsi, le pourcentage de protection maximale obtenu grâce aux levures, pour chaque champignon, était inférieur à celui obtenu lorsque la souche O à  $10^8$  ufc/ml était appliquée sur le complexe. Cette observation renforce l'hypothèse d'interactions au sein même du complexe parasitaire et de phénomènes antagonistes entre les champignons. Cependant, on ne peut exclure que l'activité des levures ait été stimulée par le complexe.

La protection obtenue est encourageante pour la mise au point d'une méthode de lutte biologique contre le complexe parasitaire même s'il faut nuancer ce propos. En effet, les expériences ont été réalisées sur base d'un complexe artificiel de trois champignons. L'ensemble des interactions rencontrées dans la réalité sur le modèle « couronne-complexe-levure » ne sont donc pas réunies.

Il faut préciser que les conditions de travail et les concentrations en pathogènes qui ont été établies étaient des conditions favorisant l'expression de la maladie. Les pourcentages de nécroses obtenus sur les objets témoins ont été extrêmement importants et de telles situations sont rarement rencontrées dans la réalité.

L'information la plus importante à retirer de cet essai réside dans la mise en évidence d'un effet antagoniste des deux souches de levures contre *Colletotrichum musae* qui est le champignon le plus pathogène et le plus fréquemment impliqué dans le complexe parasitaire.

Les résultats montrent de grandes différences entre les répétitions et les causes de cette variabilité seront discutées au chapitre 5 pour l'ensemble des expériences présentées dans ce travail.

## **Chapitre 3 : Evaluation de l'efficacité de la souche O des pourritures de la couronne en fonction du temps séparant l'application de la levure de celle du complexe**

La combinaison « souche de levure-concentration » de O à  $10^8$  ufc/ml a été identifiée comme étant la plus efficace dans l'essai précédent et a donc été retenue pour la suite des essais.

Au cours de cet essai, la souche a été appliquée 24 heures avant, 3 heures après et 15 minutes après l'inoculation des couronnes par le complexe.

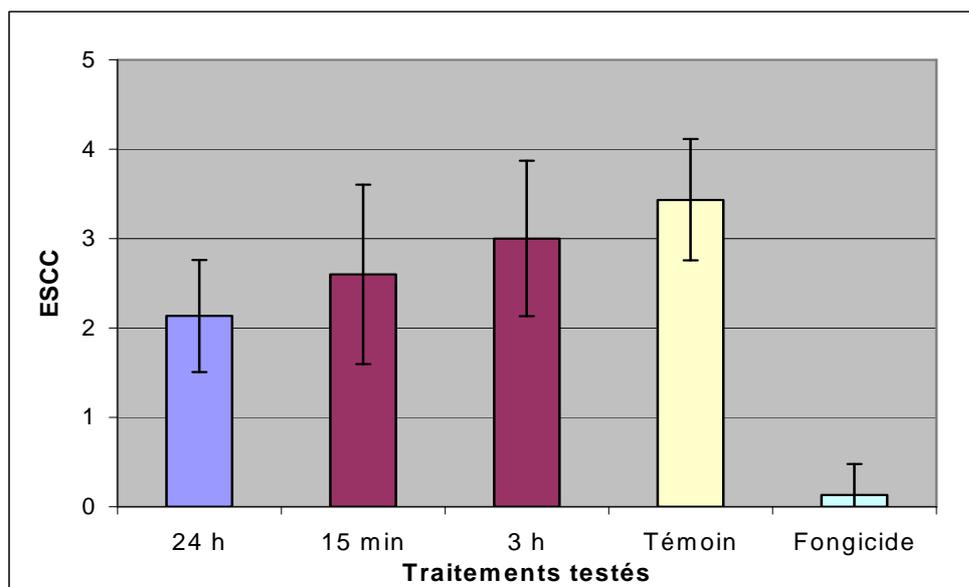
### **3.1. Evaluation en entrée mûrisserie (ESCC)**

En « entrée mûrisserie » il existait un effet très hautement significatif du traitement ( $p < 0,0001$ ) sur la maladie de la couronne. Un effet de la répétition a également été observé ( $p < 0,0001$ ).

La comparaison des moyennes a permis d'identifier 3 groupes ayant des valeurs de l'ESCC significativement différentes (Fig.39) :

- Groupe A : Témoins non traités,
- Groupe B : Traitement par les levures 15 minutes ou 3 heures après l'inoculation du complexe,
- Groupe C : Application des levures 24h avant l'inoculation du complexe parasitaire.

Le traitement fongicide était le traitement le plus efficace et les bouquets ne présentaient presque aucune colonisation externe de la couronne par le complexe parasitaire.



**Figure 39 :** Moyennes et écarts types de l'ESCC (Evaluation de la Surface de Couronne Colonisée) pour les 6 répétitions en fonction du moment d'application des levures et du type de traitement appliqué sur les couronnes après leur inoculation par le complexe. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

24 h : les levures ont été appliquées 24 heures avant le complexe artificiel.

15 min : les levures ont été appliquées 15 minutes après le complexe artificiel.

3 h : les levures ont été appliquées 3 heures après le complexe artificiel.

### 3.2. Evaluation en sortie mûrissage (PSCN)

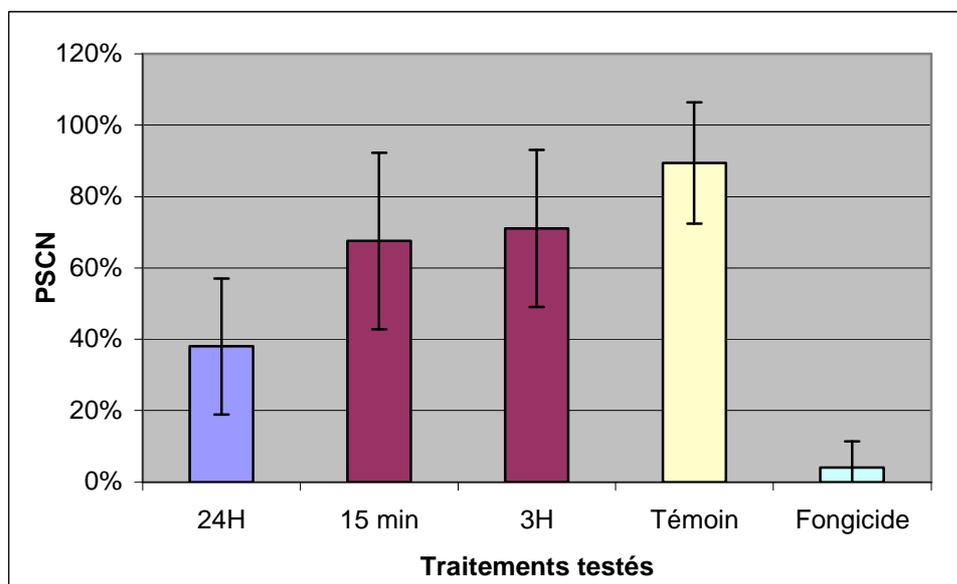
L'analyse des résultats du PSCN a conduit aux mêmes conclusions que celles obtenues lors de l'analyse de l'ESCC, et les trois groupes d'efficacité sont restés les suivants (Fig.40):

- Groupe A : Témoins non traités,
- Groupe B : Traitement par les levures 15 minutes ou 3 heures après l'inoculation du complexe,
- Groupe C : Application des levures 24h avant les pathogènes du complexe parasitaire.

La différence moyenne du PSCN entre les groupes A et C était de 51,7%. L'intervalle de confiance de cette valeur était compris entre 36,5 % et 66,9 %. De même, la différence moyenne du PSCN entre les groupes B et C était de 31,8%, avec un intervalle de confiance compris entre 18,6 % et 45,0%.

Le traitement fongicide a été le traitement le plus efficace pour limiter les nécroses causées par le complexe.

Dans ce cas, l'effet des répétitions a été nul ( $p = 0,07$ ).



**Figure 40 :** Moyennes et écarts types du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) pour les 6 répétitions en fonction du moment d'application des levures et du type de traitement appliqué aux couronnes après leur inoculation par le complexe. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

24 h : les levures ont été appliquées 24 heures avant le complexe artificiel.

15 min : les levures ont été appliquées 15 minutes après le complexe artificiel.

3 h : les levures ont été appliquées 3 heures après le complexe artificiel.

### 3.3. Discussion

Les résultats des deux évaluations sont parfaitement en accord et indiquent que le niveau de protection augmente avec le temps séparant l'application de la souche de levure de l'inoculation du complexe. Avec une valeur de 57,0%, le pourcentage de protection par rapport au témoin, apporté lors d'une application de la levure 24 heures avant le complexe a plus que doublé par rapport à celui offert lors d'une application de la souche O 15 minutes ou 3 heures après l'inoculation du complexe (22,5%). Ce renforcement de la protection lorsque les levures sont appliquées avant les pathogènes, avait déjà été observé par plusieurs auteurs. Postmaster *et al.*, (1997) sont ainsi arrivés à presque doubler le pourcentage de protection de levure contre *C. musae* sur feuilles de bananier lorsque le temps séparant les deux applications

était de 48 heures. Lorsque le temps était augmenté à 72 heures, la protection était de 90%. Jijakli (1996) a également montré que l'activité protectrice de la souche K et de la souche O contre *B. cinerea* sur pommes était supérieure à 50% en cas d'inoculation simultanée de l'agent pathogène et que la protection était proche de 80% lorsqu'un intervalle de 12 heures séparait l'application des souches de celle de *B. cinerea*.

Il est impératif de considérer l'importance de ce gain de protection dans le développement et dans la mise au point d'une lutte biologique utilisant cette souche de levure contre les maladies de pourritures de couronne. Il faut donc envisager des moyens d'application permettant l'installation des levures avant celles des pathogènes.

Cependant, le schéma de traitement tel qu'on le rencontre actuellement dans les stations d'emballage, ne semble pas favoriser l'installation de la levure. En effet, les contaminations ont lieu au moment de la découpe des mains en bouquets et surtout immédiatement après, lorsque les bouquets sont mis à tremper dans les bains de délatexage (Krauss et Johanson, 2000). Or, l'application de la souche de levure sur la couronne ne peut être réalisée qu'une fois la couronne de section carrée apparue, c'est-à-dire lorsque les mains ont été découpées en bouquets. L'application des levures sur les couronnes avant leur contamination par les pathogènes pourrait toutefois être envisagée dans les cas où la contamination se fait dans les bains de délatexage. Une méthode d'application envisageable consisterait en un dépôt de levures lors de la découpe des bouquets et de retarder le passage dans les bains de délatexage afin de permettre l'installation des levures.

Plusieurs types d'applications pourraient être envisagés : un traitement par aspersion, le dépôt d'une pâte de levure sur la couronne ou l'utilisation de patches imbibés de levures. Les deux dernières techniques permettraient de localiser le traitement sur les couronnes et de maintenir les levures en place. Des essais à grande échelle doivent être effectués afin de déterminer si ces modes d'applications sont compatibles avec les autres opérations effectuées à la station d'emballage et si les modifications qu'un tel système entraînerait, sont sans effet sur la physiologie de la banane. Effectivement, si ces changements existaient, ils pourraient, par exemple, influencer la qualité de la banane ou sa durée de conservation et entraîner un autre type de pertes. Il faut que le gain économique découlant de l'utilisation de cette méthode de lutte soit intéressant.

Si une application de la souche de levure quelques heures avant le passage des bouquets dans les bains de délatexage paraît envisageable, une application 24 heures avant ne semble pas réalisable.

La co-inoculation, bien que moins efficace, n'est cependant pas à écarter. En effet, le niveau de protection obtenu avec une co-inoculation peut être augmenté par combinaison avec d'autres méthodes de lutte. Ainsi, si la mise au point d'un système permettant la colonisation préalable des levures n'est pas possible, l'utilisation de la lutte biologique reste envisageable.

Il faut également remarquer que le pourcentage de protection offert par l'utilisation de la souche O à  $10^8$  ufc/ml a été plus faible dans cet essai que lors de l'essai antérieur. En effet, précédemment, le pourcentage de protection atteignait 56% alors qu'ici il n'était plus que de 20% pour un même temps séparant l'inoculation du complexe et l'application de la souche de levure (3 heures). Cette différence d'activité antagoniste peut, éventuellement, être mise en relation avec le PSCN des objets témoins. Dans le premier essai, il était de 39% contre 89% dans ce cas-ci. Le pourcentage de protection semble diminuer avec l'augmentation de la sévérité des symptômes. Cependant, ces différences de protection peuvent avoir d'autres origines et le nombre de résultats à ce stade est insuffisant pour établir une relation étroite entre le PSCN des objets témoins et le PSCN des objets traités avec les levures. Cette hypothèse sera néanmoins discutée au chapitre 5 en reprenant l'évolution du PSCN des objets témoins et celle du pourcentage de protection durant les trois mois d'expérimentation.

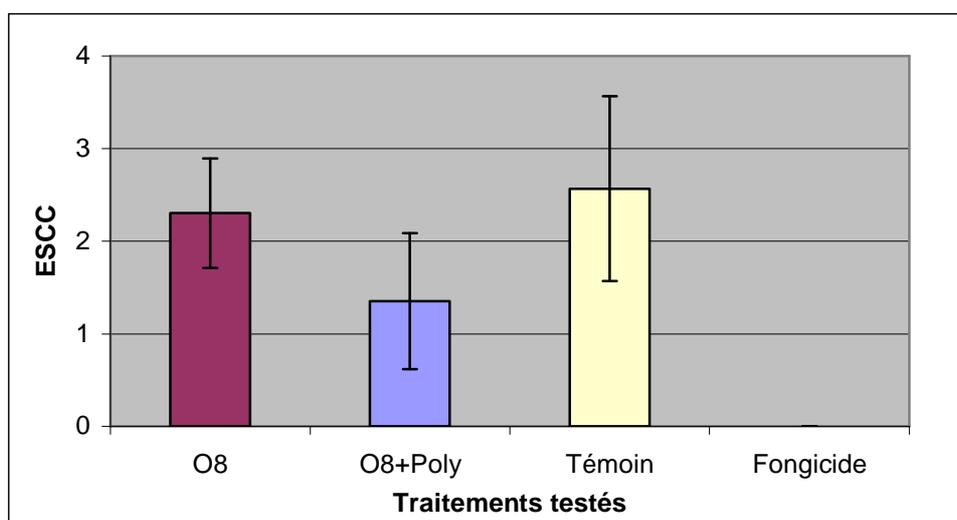
## Chapitre 4 : Evaluation de l'efficacité de la souche O à 10<sup>8</sup> ufc/ml en combinaison avec l'utilisation de polybags de 50 µm vis-à-vis des pourritures de couronne

Au cours de cet essai la souche O a été combinée à l'emploi de polybags de 50µm afin d'évaluer leurs effets combinés sur la protection.

### 4.1. Evaluation en entrée mûrissierie (ESCC)

Il existait un effet hautement significatif du type traitement ( $p= 0,004$ ) sur la colonisation externe des bouquets par le complexe parasitaire. Il y avait toujours un effet de la répétition ( $p= 0,002$ ).

Le test de Newman et Keuls a mis en évidence 3 groupes d'efficacité distincts (Fig.41). Le traitement qui a présenté le moins de nécroses, était celui où l'utilisation des polybags a été combinée à celle de la souche O à 10<sup>8</sup> ufc/ml. Venait ensuite le traitement avec la souche O à 10<sup>8</sup> ufc/ml seule et enfin, le groupe qui présentait le plus de colonisations externes : celui des témoins non traités.



**Figure 41 :** Moyennes et écarts types de l'ESCC (Evaluation de la Surface de Couronne Colonisée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement subi par les couronnes inoculées avec le complexe. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

- O8 correspond au traitement seul avec la souche O à 10<sup>8</sup> ufc/ml.
- O8+Poly correspond au traitement combiné de la souche O à 10<sup>8</sup> ufc/ml avec un polybag de 50 µm.

De nouveau, le traitement fongicide a été le plus efficace vis-à-vis du complexe parasitaire.

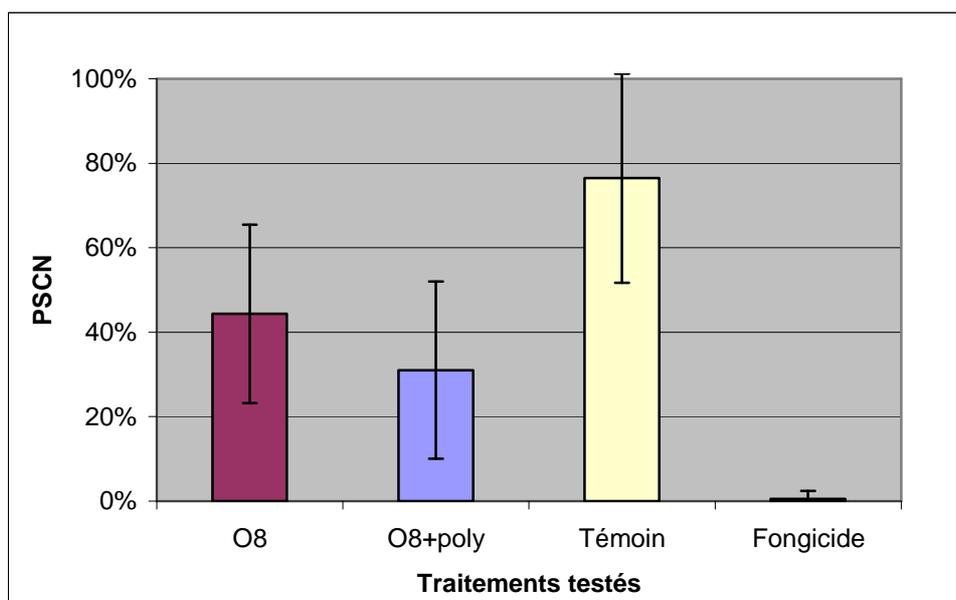
#### **4.2. Evaluation en sortie mûrisserie (PSCN)**

L'analyse de la variance du PSCN indiquait un effet très hautement significatif entre les traitements appliqués ( $p < 0,0001$ ). Il y avait toujours un effet de la répétition ( $p < 0,0001$ ).

Le test de Newman et Keuls concernant l'analyse du PSCN a confirmé les résultats obtenus lors de l'ESCC (Fig.42). En effet, les bouquets traités avec la levure et emballés dans les polybags ont montré moins de nécroses que lorsque la souche O était appliquée seule. Le témoin a révélé le pourcentage de nécroses le plus élevé.

La différence moyenne du PSCN entre le groupe ayant été traité avec la levure et emballé ensuite dans un polybag et le groupe témoin était de 45,5%. L'intervalle de confiance de cette différence était compris entre 35,2% et 55,8%.

La différence moyenne du PSCN entre la combinaison levure-polybag et le groupe ayant été traité uniquement avec la souche O était de 13,3%. L'intervalle de confiance de cette différence moyenne était compris entre 3,0% et 23,6%.



**Figure 42 :** Moyennes et écarts types du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) pour les 6 répétitions en fonction du type de traitement subi par les couronnes inoculées avec le complexe. Les traitements ne présentant pas de différences significatives entre eux sont représentés dans la même couleur. La moyenne et l'écart type du traitement fongicide sont également représentés.

- O8 correspond au traitement seul avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml.
- O8+Poly correspond au traitement combiné de la souche O à  $10^8$  ufc/ml avec un polybag de 50  $\mu$ m.

### 4.3. Discussion

Si l'emploi de polybags combiné à l'utilisation de levures a permis une réduction significative des nécroses par rapport au témoin, la différence entre l'emploi du polybag combiné aux levures et le traitement par la souche O à  $10^8$  ufc/ml seule, n'a pas été très importante. En effet, la différence de nécroses entre les deux traitements a été de 13,3% avec un seuil minimal de 3 %. Il faudrait donc évaluer si ce gain d'efficacité est rentable par rapport au surcroît de travail et au surcoût que le traitement combiné entraînerait. Cependant, en terme de pourcentage de protection par rapport au témoin, celui offert par la souche O à  $10^8$  ufc/ml était de 41,0% contre 61,0% pour une utilisation combinée avec les polybags.

La combinaison des deux méthodes renforce donc la protection de 20%, mais celle-ci reste cependant inférieure à celle fournie par le traitement fongicide. Il faudrait tenter d'optimiser l'efficacité de la combinaison des deux méthodes afin d'en tirer le meilleur pourcentage de protection. Il serait notamment intéressant d'effectuer des tests afin de chiffrer la protection qu'il serait possible d'obtenir en combinant le traitement avec le polybag et l'application des levures 24 heures avant le complexe. Comme le développement des

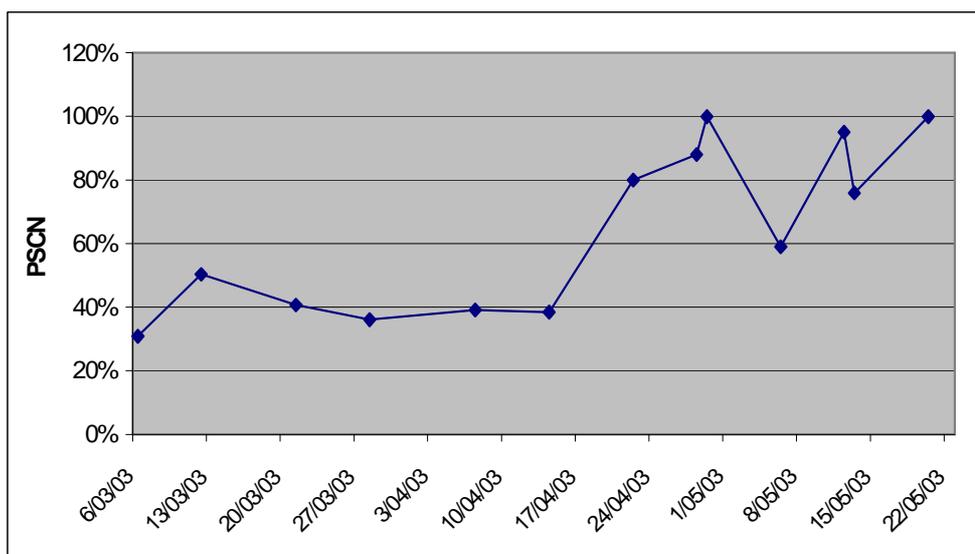
champignons a été plus fortement ralenti lorsque les levures sont appliquées 24 heures avant, il est possible que l'effet du polybag se marque davantage que ce qui est observé lors du test effectué dans ce cas-ci. Cependant, les résultats n'ont pas permis de séparer les effets du polybag de ceux du traitement par la souche O, car l'efficacité du polybag seul sur la réduction du pourcentage de nécroses n'a pas été évaluée.

D'autres combinaisons de méthodes de lutte doivent être envisagées comme par exemple un traitement à l'eau chaude avant l'application des levures. En effet, ce type de traitement a déjà été testé par Burden (1968). En laboratoire, les bananes inoculées artificiellement par *C. musae* ont été trempées pendant deux minutes dans l'eau chaude à 55°C avant la maturation. Ceci a permis un contrôle complet de la maladie. Cependant les essais réalisés à échelle commerciale, avec des fruits contaminés de manière naturelle, ne permettent pas l'obtention d'un contrôle total de la maladie. Cette diminution de l'efficacité pourrait donc être limitée en utilisant l'effet antagoniste de *Candida oleophila* mis en évidence dans ce travail.

## Chapitre 5 : Discussion générale

L'analyse de la variance, effectuée pour chaque expérimentation, a montré qu'il y avait dans la plupart des cas, un effet de la répétition. Cet effet a été observé tant au sein des modalités traitées avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml que chez les témoins non traités. Ces fortes variations entre les répétitions n'ont donc pas été causées par le traitement effectué par la souche de levure.

La figure 43 retrace l'évolution du PSCN des objets témoins ayant subi les mêmes opérations d'inoculations au fil des semaines et montre que la variabilité qui a été observée sur le PSCN est relativement importante. En effet, l'intensité de l'expression des symptômes varie de 31% à 100% de surface de couronne nécrosée au cours des dix semaines considérées. Ce phénomène avait déjà été décrit par Lukezic *et al.* (1966) qui ont observé des variations dans la sévérité de la maladie au cours du temps lorsque leurs expériences s'effectuaient sur dix mois.



**Figure 43 :** Variation du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) des objets témoins inoculés avec le complexe entre le 6 mars et le 22 mai 2003.

Ces différences dans l'expression des symptômes peut être dues à plusieurs facteurs. Premièrement, il est possible que cette variabilité provienne d'une différence de concentration en spores dans les solutions d'inoculation. Celle-ci peut être causée par une mauvaise préparation de la suspension de départ ou encore par une mauvaise homogénéisation de celle-ci avant chaque inoculation. Cependant, le calcul des spores et l'établissement de la

suspension d'inoculation ont toujours été préparés de manière rigoureuse. De même, les suspensions ont été correctement homogénéisées à chaque prélèvement d'inoculation. Ainsi, même si l'existence de légères différences de concentration en spores entre les semaines n'est pas à exclure, celles-ci ne sont pas suffisantes pour expliquer de telles différences dans l'expression des symptômes.

Une autre source d'erreurs peut être due à un manque de maintien de la goutte d'inoculum sur la section de découpe de la couronne. Cependant, cela restait occasionnel et se produisait au maximum sur un seul des 5 bouquets d'une modalité. Or, les tendances à la baisse ou à la hausse du niveau de nécroses s'observent de manière générale sur l'ensemble des bouquets de la modalité. Ainsi, même si ce phénomène contribue éventuellement aux différences observées, il ne peut en expliquer la totalité.

D'autres facteurs se sont avérés être incontrôlables. C'est le cas des conditions environnementales lors de la découpe et de l'inoculation des bouquets. En effet, ces opérations se déroulaient dans une pièce non conditionnée où les températures et l'humidité relative étaient fonctions de celles rencontrées à l'extérieur. Il faut souligner que ces deux paramètres ont été extrêmement variables au cours des trois mois d'expérimentations. Il faudrait envisager d'effectuer ces tests dans des locaux où les atmosphères sont contrôlées afin de réduire l'impact que pourraient avoir les conditions environnementales, lors des manipulations, sur les bananes, sur les pathogènes et sur la colonisation des couronnes par ces derniers.

D'autres paramètres, non maîtrisables, pourraient être responsables de cette grande différence au niveau de l'expression de symptômes observée au cours du temps. C'est le cas des bananes elles-mêmes dont la physiologie complexe n'est pas encore maîtrisée. Les régimes ont été systématiquement récoltés à 90°C jours afin d'homogénéiser au maximum le matériel végétal et de réduire les variabilités dans l'expression des symptômes pouvant provenir de la banane et de sa physiologie. Malgré le contrôle de ce paramètre, l'existence d'une différence de sensibilité des bananes à la maladie selon les semaines n'est pas à exclure. Chillet *et al.*(1996) ont d'ailleurs expliqué que les changements saisonniers touchant la physiologie du fruit étaient liés à l'évolution de facteurs climatiques et que ces changements physiologiques pourraient être responsables des variations de qualité observées au cours de l'année. Nolin (1989) cite l'état physiologique du fruit, en rapport avec le stade de récolte, les conditions climatiques au cours de la phase de croissance du régime et la nutrition minérale et

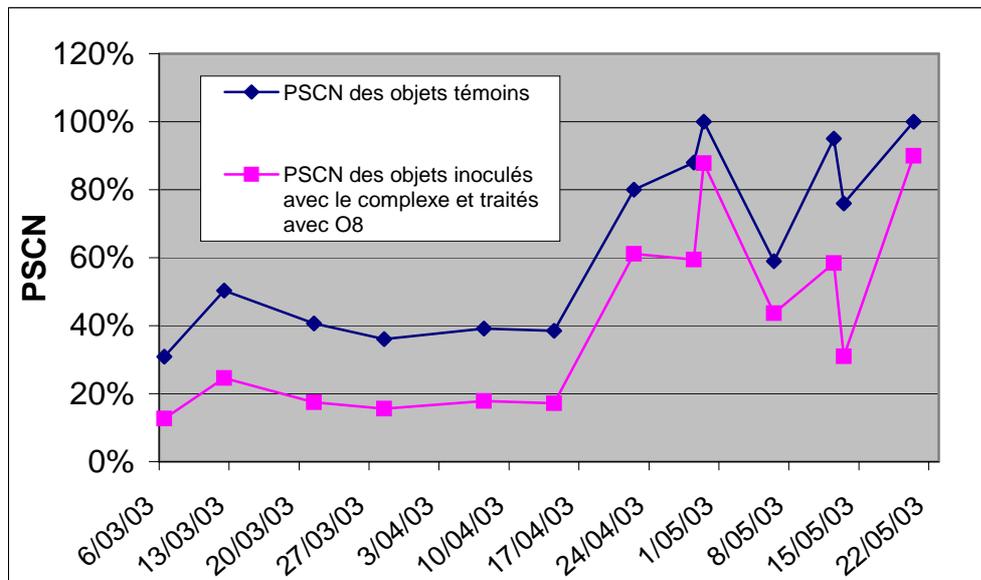
hydrique, comme étant un facteur intervenant dans le développement de maladie et dans son contrôle. Selon Hostachy *et al.* (1990), l'état physiologique des fruits au moment de la récolte conditionne leur évolution ultérieure en mûrisserie et notamment la vitesse de développement des champignons.

Les analyses de la variance effectuées dans ce travail ont permis de mettre en évidence l'existence de différences significatives au niveau de l'expression des symptômes entre les différents régimes prélevés le même jour. Ce phénomène avait déjà été observé par Frossard *et al.*, (1977) qui ont d'ailleurs précisé que la sensibilité des fruits aux pourritures de couronne variait non seulement d'un régime à l'autre, mais également, sur un même régime, d'une main à l'autre.

Cette différence de sensibilité observée entre régimes récoltés le même jour démontre l'importance de la physiologie de la banane dans l'expression des symptômes. Elle prouve que, même si le seuil de 900°C jours permet d'homogénéiser la récolte, il n'a cependant pas permis d'atteindre un état physiologique reproductible expliquant en partie au moins le manque de répétabilité des expériences effectuées.

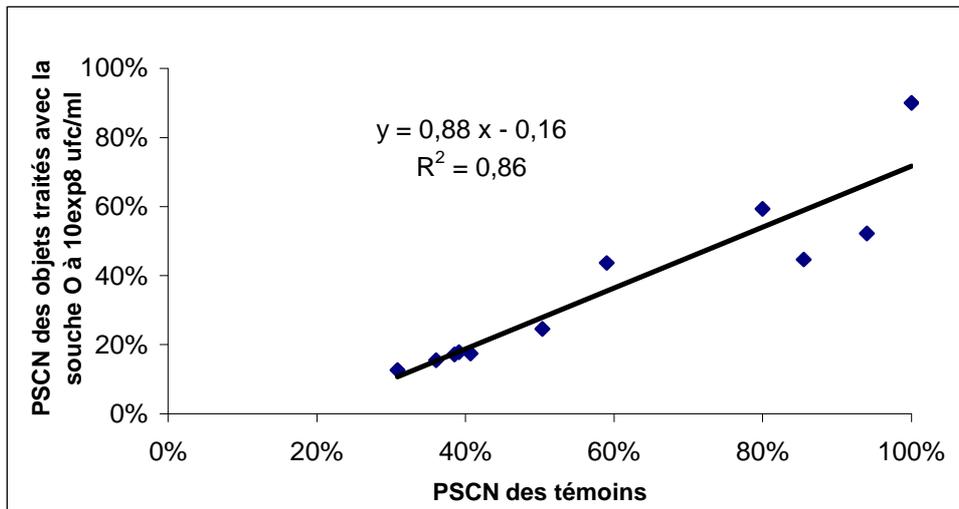
La figure 43 a également mis en évidence que plus les répétitions s'étaient étalées dans le temps, plus les différences observées entre elles étaient importantes. Pour permettre de diminuer cet effet des répétitions, les 6 répétitions d'une expérimentation devraient être effectuées autant que possible dans un temps minimal. Le premier essai concernant *C. musae* et *F. moniliforme* a été échelonné sur 6 semaines. L'analyse de la variance concernant ces deux champignons a montré une différence très hautement significative entre les répétitions. Par contre, dans le cas de *Cephalosporium* sp. et du complexe, les expériences se sont déroulées sur 4 semaines et les analyses de la variance ont indiqué qu'il n'y avait pas de différences entre les répétitions. Les deux autres essais concernant, pour l'un les temps d'incubation et pour l'autre l'utilisation combinée de polybags, ont pu, chacun, être effectués en deux semaines. C'est probablement cette réduction du temps qui a permis aux expériences concernant les temps d'incubations d'être répétables. Toutefois, lors des essais avec polybags, la variabilité du PSCN durant cette période (24/04/03-08/05/03) était si importante que la réduction de la période de manipulation, a été insuffisante pour réduire la variabilité des résultats entre les différentes répétitions.

De grandes différences dans le pourcentage de protection ont également été rencontrées entre les différentes expériences utilisant pourtant à chaque fois le même protocole. Pour tenter d'expliquer cette variation du pourcentage de protection, l'évolution du PSCN des objets inoculés avec le complexe et traités avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml a été comparée à l'évolution du PSCN des objets témoins (Fig.44). Il apparaît clairement que les deux évolutions ont suivi la même tendance. Cependant, il semble que la protection diminue lorsque l'intensité des symptômes augmente.



**Figure 44 :** Variations observées, entre le 6 mars et le 22 mai 2003, du PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) des objets témoins inoculés avec le complexe parasite artificiel et des objets inoculés avec le même complexe et traités avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml.

Il semble donc possible, au vu de ces graphiques, d'émettre l'hypothèse selon laquelle il existe une relation entre la sévérité de la maladie et le pourcentage de protection. Dans le but de mettre cette relation en évidence, une droite de régression du PSCN des objets traités en fonction du PSCN des objets témoins a été effectuée. Une équation reliant les deux variables a été établie et la droite présente un coefficient de corrélation de 0,93 (Fig.45).



**Figure 45 :** Relation entre le PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) des objets témoins non traités inoculés avec le complexe parasitaire artificiel et le PSCN (Pourcentage de Surface de Couronne Nécrosée) des objets inoculés avec le complexe parasitaire artificiel et traités avec la souche O à  $10^8$  ufc/ml.

Il existe donc une relation étroite entre la sévérité des symptômes et la protection que peuvent apporter les levures. Cette observation permet de penser que la protection offerte par les levures sera plus importante dans les conditions réelles où l'expression des symptômes est rarement du niveau rencontré dans ce modèle expérimental.

## Conclusions et perspectives

L'activité antagoniste de *Pichia anomala* souche K ou *Candida oleophia* souche O appliquées à différentes concentrations a été évaluée contre les pourritures de la couronne du bananier. Ces tests ont été effectués sur trois champignons séparément et en mélange pour refléter le complexe.

De cet essai, il ressort que:

1. les levures n'ont pas présenté le même niveau de protection sur l'ensemble des pathogènes testés. La gamme de concentration testée ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  ufc/ml) n'a pas toujours été suffisante pour mettre en évidence des niveaux de protection significativement différents entre les concentrations.
2. la souche O a offert la protection la plus efficace vis-à-vis du complexe (56%) et le niveau de protection obtenu est comparable à ceux trouvés dans la littérature,
3. les niveaux de protection vis-à-vis du complexe ont été supérieurs à ceux obtenus contre les pathogènes individuels. Il existerait donc des effets antagonistes entre les trois parasites fongiques étudiés. Il est également possible que l'activité protectrice des souches de levures ait été stimulée lorsque celles-ci ont été appliquées contre le complexe parasitaire,
4. la protection offerte par les souches de levures reste inférieure à une protection de traitement fongicide.

Après avoir évalué l'effet de la concentration et de la nature de la souche de levure sur l'efficacité du traitement, l'influence du temps séparant l'application des levures de celle des pathogènes a été mesurée.

Il est ressorti de cette deuxième expérience que:

1. la protection a été doublée lorsque la souche O a été appliqué 24 heures avant le complexe par rapport à une application effectuée 15 minutes et 3 heures après le complexe.
2. la protection offerte par la souche O reste inférieure à une protection de traitement fongicide.

L'effet de l'utilisation combinée de polybags et de la souche O a également été évalué. Les résultats de cette expérience montrent que :

1. la combinaison des deux méthodes a permis d'augmenter le niveau de protection par rapport à la protection offerte par la souche O seule.
2. la protection offerte par la combinaison des deux méthodes reste cependant inférieure à une protection de traitement fongicide.

L'analyse générale des résultats obtenus durant les trois mois d'expériences a permis d'établir une corrélation entre la sévérité de la maladie et le niveau de protection offert par la souche O à  $10^8$  ufc/ml. Lorsque les pourritures sont sévères, le niveau de protection diminue.

L'ensemble de ces expériences a permis de mettre en évidence que les deux souches testées présentaient des effets antagonistes contre le complexe parasitaire utilisé. L'antagonisme détecté n'a pas été suffisant pour supprimer les nécroses causées par le complexe, mais il les a réduits sensiblement. La protection offerte reste limitée et variable et il n'est pas envisageable de contrôler la maladie par le seul emploi des levures. Il faudrait donc combiner cette alternative à d'autres méthodes de lutte afin de permettre un meilleur contrôle des pourritures de couronne.

Vu la complexité et le nombre de pathogènes impliqués dans cette maladie, il serait intéressant d'utiliser un mélange d'agents antagonistes afin d'agrandir le spectre de pathogènes contre lesquels une activité protectrice existe. Cette alternative a déjà été citée par de nombreux auteurs (Cook, 1993; Krauss et Johanson, 2000 ; Janisiewicz et Korsten, 2002). L'utilisation d'une formulation de ces levures devrait également permettre de renforcer et de stabiliser la protection (Jijakli *et al.*, 2002).

L'objectif à long terme est la réalisation d'essais en conditions réelles. Toutefois, avant de procéder à ces essais, il faudrait poursuivre des tests en conditions contrôlées en impliquant un spectre plus large de pathogènes rencontrés partout dans le monde. Ces essais permettront d'évaluer le potentiel réel de la souche O pour lutter contre les pourritures de couronne dans d'autres situations que celles des Antilles françaises.

Il est probable que cette méthode de lutte biologique puisse être valorisée en la combinant à d'autres méthodes de lutte, d'autant plus que les infections naturelles sont moins sévères que celles qui ont été provoquées artificiellement dans ce travail. Et même si les nécroses causées par le complexe parasitaire ne sont pas totalement éliminées, cette alternative pourrait les réduire jusqu'à un niveau acceptable par les producteurs, les consommateurs et les commerciaux qui sont de plus en plus confrontés aux problèmes causés par la lutte chimique.

**Agati J.A.** (1992). Banana stem and fruit rot. *Philippine Agriculture*, **10**, 411-422.

*Atlas des Départements français d'outre-mer. La Guadeloupe.* Ed. CNRS. 1982

**Badger A.M.** (1965). Influence of relative humidity on fungi causing crown rot of boxed bananas. *Phytopathology*, **55**, 688-692.

**Bakry F., Carreel F., Caruana M.L., Côte F.X., Jenny C. et Tezenas du Montcel H.**(1997). Les bananiers. Dans : *L'amélioration des plantes tropicales*, Charrier A., Hamon S., Jacqot M. , Nicolas D. (eds.), Montpellier, CIRAD, ORSTOM, 109-139.

**Barnett H.L.** (1965). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Burgess Publishing Company*, Second edition, 48-195.

**Bélangier R.R., Dufour N., Caron J. and 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 Sciences Technol.*, **5**, 41-53.

**Brown G. E.** (1975). Factors affecting postharvest development of *Collectotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. *Phytopathology*, **65**, 404-409.

**Brown A.E. and Swinburne T.R.** (1980). The resistance of immature banana fruits to anthracnose. *Phytopath. Z.*, **99**, 70-80.

**Burden O.J.** (1968). Reduction of banana anthracnose following hot-water treatment of the green fruit. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, **25**, 135-144.

**Champion J.** (1963). Le bananier. Paris, Maisonneuve et Larose, 263pp.

**Chillet M. et de Lapeyre de Bellaire L.** (1996a). Conditionnement en polybag pour le contrôle de l'antracnose de blessures des bananes. *Fruits*, **51**, 163-172.

**Chillet M. et de Lapeyre de Bellaire L.** (1996b). Elaboration de la qualité des bananes au champ. Détermination de critères de mesure. *Fruits*, **51**, 317-326.

**Chuang T.Y. and Yang H.R.** (1993). Biological control of banana anthracnose. *Plant Pathology Bulletin*, **2**, 71-77.

**Conway W.S., Sams C.E., Abbott J.A. and Bruton B.D.** (1991). Postharvest calcium treatment of apple fruit to provide broad-spectrum protection against postharvest pathogens. *Plant disease*, **75**, 620-622.

**Cook R.J.**, 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, **31**, 53-80.

**Cook R.J., Thomashow L.S., Weller D.M., Fujimoto D., Mazzola M., Bangera G. and Kim D.S.** (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4197-4201.

**Dagnelie P.** (1994). Théorie et méthodes statistiques. Applications agronomiques. *Les Presses Agronomiques de Gembloux*, **2**, 463p.

**Daudin J.** (1953). Epistillage des regimes de bananas sur pied. *Fruits*, Vol. 8, n°10, 488-489.

**De Costa D.M. and Subasinghe S.S.N.S.** (1998). Antagonistic bacteria associated with the fruit skin of banana in controlling its postharvest diseases. *Tropical Sciences*, **38**, 206-212.

**De Jager E.S., Hall A.N., Wehner F.C. and Korsten L.** (2001). Microbial ecology of the mango phylloplane. *Microb. Ecol.*, **42**, 201-207.

**de Lapeyre de Bellaire L.** (1999). Bio-écologie de *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, agent de l'antracnose des bananes, dans les conditions tropicales humides de la Guadeloupe. *Thèse de doctorat*, Paris XI Orsay. 100pp.

**de Lapeyre de Bellaire L., Chillet M., Dubois C. and Mourichon X.** (2000). Importance of different sources of inoculum and dispersal methods of conidia of *Colletotrichum musae*, the causal agent of banana anthracnose, for fruit contamination. *Plant Pathology*, **49**, 782-790.

**de Lapeyre de Bellaire L., Chillet M. et Mourichon X.** (2000). Elaboration of an early Quantification method of quiescent infections of *Colletotrichum musae* on bananas. *Plant Disease*, **84**, 128-133.

**de Lapeyre de Bellaire L. et Dubois C.** (1997). Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations. *Plant Disease*, **81**, 1378-1383.

**de Lapeyre de Bellaire L. and Mourichon X.** (1997). *The pattern of fungal contamination of the banana bunch during development and potential influence on incidence of fcrown-rot and anthracnose diseases.* *Plant Pathology*, **46**, 481-489.

**de Lapeyre de Bellaire L. et Nolin J.** (1994). Amélioration du contrôle du chancre sur les bananes d'exportation et traitements post-récolte. *Fruits*, **49**, 179-185.

**Dickburt C., Lepoivre P. and Jijakli M. H.** (2001).  $\beta$ -1,3- glucans and galacturonic acid enhanced the antagonistic activity of yeasts against apples postharvest rots. *Phytopathology* **S23**.

**Dorel M.** (2000). Effet des pratiques culturales sur les propriétés physiques des sols volcaniques de Guadeloupe et influence sur l'enracinement du bananier. *Thèse de doctorat*, UCL.

**Droby S. and Chalutz E.** (1994). Mode of action of biocontrol agents of post-harvest diseases. In: *Biological control of post-harvest diseases. Theory and Practice.* Wilson C.L and Wisniewski M.E., CRC Press, 63-75.

- Eckert J. W. and Sommer N. F.** (1967). Control of diseases of fruits and vegetables by post-harvest treatment. *Annual review of phytopathology*, **5**, 391-421.
- Eckert J. W. and Ogawa M. J.** (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual review of phytopathology*, **23**, 421-454.
- Finlay A.R., Lubin C and Brown A.E.** (1992). The banana stalk as a source of inoculum of fungal pathogens which cause crown rot. *Tropical Science*, **32**, 343-352.
- Finlay A. R. and Brown A.E.** (1993). The relative importance of *Colletotrichum musae* as a crown-rot pathogen on Windward Island bananas. *Plant Pathology*, **42**, 67-74.
- Fravel R. D.** (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual review of phytopathology*, **26**, 75-91.
- Friel D.** (2001). Caractérisation génétique partielle de *Pichia anomala* (souche K), antagoniste vis-à-vis de *Botrytis cinerea* sur pommes en conservation. *Mémoire de fin d'étude*, FUSAGx. 72p.
- Frossard P., Laville E. et Plaud G.** (1977). Etude des traitements fongicides appliqués aux bananes après récolte. Action de l'imazalil. *Fruits*, **32**, 673-677.
- Greene G.L. and Morales C.** (1967). Tanins as the cause of latency in anthracnose infections of tropical fruits. *Turrialba*, **17**, 447-449.
- Grevesse C., Jijakli M.H., Duterme O., Colinet D and Lepoivre P.** (1998). Preliminary study of exo-B-1,3-glucanase encoding genes in relation to the protective activity of *Pichia anomala* (strain K) against *Botrytis cinerea* on postharvest apples. In: *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*. OIBC Bulletin, **21**, 81-89.
- Grevesse C.** (2002). Study of the implication of exo- $\beta$ -1,3- glucanase encoding genes in the biocontrol activity of *Pichia anomala* (strain K) against *Botrytis cinerea* on post-harvest apple. *Thèse de doctorat*, FUSAGx. 152p.
- Grevesse C., Lepoivre P., and Jijakli M.H.** (2003). Characterisation of the exoglucanase encoding gene PaEXG2 and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* strain K. *Phytopathology* (accepté pour publication).
- Griffie P.J. and Burden O.J.** (1974). Incidence and control of *Colletotrichum musae* on bananas in the Windward Islands. *Annals of Applied Biology*, **77**, 11-16.
- Griffie P.J. et Burden O.J.** (1976). Fungi associated with crown rot of boxed bananas in the Windward Islands. *Phytopath. Z.*, **85**, 149-158.
- Hostachy B., Vegh I., Leroux P., Jacquemot E., Foucher S. et Pigou R.** (1990). Bananes de Martinique : Incidence des problèmes fongiques sur la qualité. *Phytoma*, **420**, 37-43.

**Ippolito A. and Nigro F.** (2000). Impact of preharvest application of biological control agents on post-harvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop protection*, **19**, 715-723.

**Janisiewicz. W.** (1991). Biological control of post-harvest diseases, in: *Handbook of applied mycology*, vol. **1**, D.K. Arora, B. Rai, K.G. Mukerji and G.R. Knudsen, eds., Marcel Dekker, Inc., New York, USA pp. 301-325.

**Janisiewicz, W.** (1988). Biocontrol of post-harvest diseases of apples with antagonist mixture, *Phytopatology* , **78**, 194-198.

**Janisiewicz J.W. and Korsten L.** (2002). Biological control of post-harvest diseases of fruits. *Annual Reviews Phytopathology*, **40**, 411-441.

**Jeffries P., Dodd J.C., Jeger M.J. and Plumbley R.A.** (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, **39**, 343-366.

**Jijakli M. H., Choutka C. and Lepoivre P.** (1993). Formulation and integrated use of two antagonistic yeast to post-harvest treatment against diseases on apples, in : *Biological control of fruit and foliar disease*, P. Lepoivre, ed., Proceedings of an EC Workshop, Gembloux, Belgium pp. 107-117.

**Jijakli M.H.** (1996). Etude des propriétés antagonistes de deux souches de levures vis-à-vis de *Botrytis cinerea* Pers. sur pommes en conservation. *Thèse de doctorat*, FUSAGx. 173p.

**Jijakli M.H. and Lepoivre P.** (1998). Characterization of an exo-B-1,3-glucanases produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, **88**, 335-343.

**Jijakli M. H., Lepoivre P. and Grevesse C.** (1999). Yeast species for biocontrol of apple postharvest diseases: an encouraging case of study for practical use. In : *Biotechnological approaches in biocontrol of plant pathogens*. Edited by Mukerji *et al.*, Kluwer Academic/Plenum publishers, New York.

**Jijakli M.H., De Clercq D., Dickburt C and Lepoivre P.** (2002) Pre- and post-harvest practical application of *Pichia anomala* strain K, B-1,3-glucans and calcium chloride on apples : two years of monitoring and efficacy against post-harvest diseases. In: *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*. OIBC Bulletin, **25**, 29-32.

**Jijakli M.H.** (2003). La lutte biologique en phytopathologie. In : *Phytopathologie*, Lepoivre P., eds., Bruxelles, Belgique : De Boeck, 289-317.

**Joas J.** (1997). Programme qualité de la banana d'exportation. Rapport d'essai sur l'emploi des U.V. en post-récolte. *CIRAD, Document interne*.

**Johanson A. and Blazquez B.** (1992). Fungi associated with banana crown rot on field-packed fruit from the Windward Islands and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazilil. *Crop Protection*, **11**, 79-83.

**Jones D.R.** (1999). Diseases of banana, abaca and enset. *Cabi Publishing*.

**Kanapathipillai V.S., Ahmad R. and Mahamad M.I.** (1987). The effect of sterile filtrates of *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp and 4 Kgy Irradiation on the spore germination of *Colletotrichum musae*. In: *Movements of pests and control strategies*, Singh K.G., Manolo P.L., Sastrontomo S.S., Chan K.C., Lim L.G., Ganapathi A.N., Rahim M.A.A., Durai P.S.S. et Doss M.C. (eds.), Kuala Lumpur, Malaysia, ASEAN Plant and Quarantine Centre and Training Institute, 283-292.

**Khan S.H., Aked J. and Magan N.** (2001). Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. *Plant pathology*, **50**, 601-608.

**Knight C.** (1982). Pathogenicity of some fungi associated with crown rot of bananas. *Phytopath. Z.*, **104**, 13-18.

**Krauss U.** (1996). Establishment of a bioassay for testing control measures against crown rot of banana. *Crop Protection*, **15**, 269-274.

**Krauss U., Bidwell R. and Ince J.** (1998). Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. *Biological control*, **13**, 111-119.

**Krauss U. and Johanson A.** (2000). Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands. *Crop Protection*, **19**, 151-160.

**Leibniger W., Breuker B., Hahn M. and Mendgen K.** (1997). Control of post-harvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, **87**, 1103-1110.

**Liu X., Huang S., Yang Y. and Xie Y.** (1995). Effects of phenols on growth and reproduction of *Colletotrichum Corda* in latent infection. *Acta Mycological Sinica*, **14**, 277-282.

**Loeillet D.** (1993). Organisation commune des marchés de la banane : une nouvelle donne bananière européenne. *Fruits*, **48**, 46-48.

**Loeillet D.** (1998). Banane. In: *Cyclope*, Chalmin P. (eds.), Economica, 288-291

**Lukezic F. L. and Kaiser J.** (1966). Aerobiology of fusarium roseum "Gibbosum" associated with crown rot of boxed bananas. *Phytopathology*, **56**, 545-548.

**Lukezic F. L., Kaiser J. and Martinez M.M.** (1967). The incidence of crown rot of boxed bananas in relation to microbial population of the crown tissue. *Canadian Journal of Botany*, **45**, 413-421.

**Magan N. and Baxter E.S.** (1993). Potential for post-harvest biological control of anthracnose of bananas. *Bulletin OICB SROP*, **16**, 136-140.

**Manuel du planteur** (1998). SICABAM, Service Agrotechnique

**Marin H.D., Sutton T.B., Blankenship S.M. and Swallow W.H.** (1996). Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. *Plant disease*, **80**, 525-528.

**Massart S. et Jijakli M.H.** (2003). Amélioration génétique de deux souches de levures antagonistes vis-à-vis de *Botrytis cinerea* par l'identification des gènes de biocontrôle. Rapport intermédiaire de la convention n°6060 du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture. Administration Recherche et Développement. Région Wallonne. Gembloux, Belgique, 41p.

**Meredith D.S.** (1962). Some fungi on decaying banana leaves in Jamaica. *Transactions of the British Mycological Society*, **45**, 335-347.

**Meredith D.S.** (1971). Transport and storage diseases of bananas: biology and control. *Tropical Agricultural*, **48**, 35-50.

**Misra A.P. and Singh R.P.** (1962). Effect of temperature and humidity on the development of banana anthracnose. *Indian Phytopathology*, **15**, 11-13.

**Mourichon X.** (1993). Parasites fongiques du bananier. *Fruits*, **48**, 26-28./Spécial bananes : défense des cultures.

**Murihead I.F. and Deverall B.J.** (1981). Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum gloeosporides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, **98**, 137-144.

**Nelson E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O.** (1983). Fusarium species. An illustrated Manuel for identification. *The Pennsylvania State University Press*, 84-131.

**Nolin J.** (1989). Qualité et traitement fongicide. IRFA/CIRAD.

**Pacico R.** (2001). Influence d'atmosphères modifiées obtenues à l'aide de polybags sur la pathologie du complexe de la maladie de la pourriture de la couronne. Mémoire de fin d'études, FUSAGx, 60pp.

**Pineros G. and Juan D.** (1994). Etude d'une climotoposéquence de sols dérivés de matériaux volcaniques récents (Côte sous le vent de la Basse-Terre, Guadeloupe). Mémoire de fin d'études, UCL. 112pp.

**Ploetz R.C., Zentmyer G.A., Nishijima W.T., Rohrbach K.G. and Ohr H.D** (1994). Compendium of Tropical Fruit Diseases. *APS Press*, 4-9.

**Postmaster A., Kuo J., Sivasithamparam and Turner D.W.** (1997). Interaction between *Colletotrichum musae* and antagonistic microorganisms on the surface of banana leaf discs. *Scientia Horticulturae*, **71**, 113-125.

**Ragazzi A. and Turco E.** (1997). Antagonistic effects of some fungi of banana fruit against *Colletotrichum musae*. *Journal of plant diseases and protection*, **104** (3), 281-288.

**Shillingford C.A.** (1977). Control of banana fruit rot and of fungi that contaminate washing water. *Tropical Science*, **19**, 197-203.

**Simmonds J.H.** (1941). Latent infection in tropical fruits discussed in relation to the part played by species of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. *Proceedings of the Royal Society of Queensland*, **52**, 92-120.

**Simmonds J.H.** (1963). Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species causing ripe rots of tropical fruits. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*, **20**, 373-424.

**Slabaugh W. R. and Grove M.D.** (1982). Postharvest diseases of bananas and their control. *Plant disease*, **66**, 746-750.

**Stover R.H. and Simmonds N.W.** (1987). Bananas. Essex, Longman, third edition, 468 pp.

**Swinburne T.R.** (1963). Quiescent infections in post-harvest diseases. In: *Post-harvest Pathology of Fruits and Vegetables*, Dennis C. (ed.) London, *Academic Press*, 1-21.

**Walker M.G.** (1998). Yeast physiology and biotechnology. *John Wiley and Sons Ltd.* England. 350p.

**Waller J. M.** (1992). *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*, Bailey J.A. and Jeger M.J. (eds.), Wallingford, CAB international, 167-185.

**Whipps J.M. and Lumsden R.D.** (2001). Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. *CABI Publishing*, UK. 390p.

**Wilson L. C. and Pusey P. L.** (1985). Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant disease*, **69**, 375-378.

**Wilson L. C. and Wisniewski M. E.** (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: and emerging technology. *Annual review of phytopathology*, **27**, 425-441.

**Wilson C.L., Wisniewski M.E., McLaughlin R.J., Chalutz E.** (1990). Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of post-harvest diseases of apple with *Candida sp.*. *Phytopathology*, **80**, 456-461.

**Wilson C. L., Wisniewski M. E., Biles C.L, McLaughlin R., Chalutz E. and Droby S.** (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection*, **10**, 172-177..

**Wilson C.L., El Ghaouth A., Chalutz E., Droby S., Stevens C, Y Lu J., Khan V. and Arul J.** (1994). Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant disease*, **78**, 837-844.

