

## **ROLE DES ACIDES AMINES DANS L'ACTIVITE ANTAGONISTE D'*AUREOBASIDIUM PULLULANS* VIS-A-VIS DE LA POURRITURE BLEUE DES POMMES EN POST-RECOLTE**

**KRIMI BENCHEQROUN Sanae<sup>1,2</sup>, BAJJI Mohammed<sup>2</sup>, LABHILILI Mustapha<sup>3</sup>, EL  
JAAFARI Samir<sup>4</sup>, DURIEUX Alain<sup>5</sup>, JIJAKLI M. Haïssam<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Centre Régional de la Recherche Agronomique de Settat B.P. 589, Settat, Maroc ; email :  
[Krimisanae@gmail.com](mailto:Krimisanae@gmail.com);

<sup>2</sup> Unité de phytopathologie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Passage des  
Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgique;

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique Guich, BP 415 Rabat, Maroc;

<sup>4</sup> Université de Moulay Ismail, BP 4010, Meknès, Maroc;

<sup>5</sup> Unité de Biotechnologie, Université Libre de Bruxelles, Institut Meurice, Avenue Emile  
Gryzon 1, B-1070 Bruxelles, Belgique

### **RESUME**

*Aureobasidium pullulans* (souche Ach1-1) a montré une grande efficacité vis-à-vis de *Penicillium expansum* agent de la pourriture bleue des pommes en conservation. Le présent travail a été réalisé dans le cadre de l'analyse des mécanismes d'action qui sont les plus impliqués dans son activité antagoniste. Dans des essais *in vivo* sur pommes blessées, l'effet protecteur de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* a été significativement affaibli par l'ajout dans les blessures de concentrations élevées en acides aminés. L'importance de la réduction étant dépendante de la concentration appliquée, a montré que la compétition pour les acides aminés joue un rôle important dans la suppression de *P. expansum*. Ce résultat a été appuyé par l'analyse biochimique de la cinétique de l'épuisement des acides aminés dans les blessures des pommes qui a dévoilé que ces composés et particulièrement la sérine, la glycine et l'acide glutamique sont mieux métabolisés par la souche antagoniste que par le pathogène. L'ajout en excès de ces trois acides aminés individuellement dans les blessures des pommes a fortement réduit l'efficacité de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum*. Ainsi, ces acides aminés semble être parmi les éléments les plus limitants dans le mécanisme de la compétition. Ces résultats indiquent que l'antagoniste *A. pullulans* souche Ach 1-1 exerce une activité fongistatique plus que fongicide vis-à-vis de *P. expansum* et agit par une compétition efficace pour les éléments nutritifs limitants des blessures des pommes et particulièrement les acides aminés sans affecter la viabilité du pathogène.

**Mots clés :** *Aureobasidium pullulans*, lutte biologique, pomme, *Penicillium expansum*, modes d'action, acides aminés.

### **INTRODUCTION**

Parmi les méthodes de lutte alternatives développées en vue de compléter ou de remplacer partiellement l'usage de fongicides synthétique, la lutte biologique s'avère une mesure très prometteuse, spécialement dans le domaine du post-récolte. Un grand nombre de levures et de bactéries ont été rapporté comme des agents biologiques efficaces contre les maladies de post récolte (Punja and Utkhede, 2003; Spadaro and Gullino, 2004; Fravel, 2005;

Massart and Jijakli, 2007). Récemment la souche Ach1-1 d' *Aureobasidium pullulans* a été sélectionnée pour son importante activité de biocontrôle vis-à-vis de *Penicillium expansum* sur pommes blessées (Achbani *et al.*, 2005). Afin de développer une stratégie de lutte biologique efficace, l'étude des modes d'action revêt une importance cruciale. Dans des études précédentes, la compétition pour la nutrition s'est révélée être le principal mécanisme d'action de la souche Ach1-1 (Krimi Bencheqroun *et al.*, 2006 ; Krimi Bencheqroun *et al.*, 2007). Parmi les composés des pommes, les acides aminés ont été les plus impliqués dans ce mécanisme de compétition, plus que les sucres et les vitamines. L'objectif du présent travail est d'évaluer le rôle des acides aminés dans l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* sur les fruits en conservation et d'identifier ceux qui sont les plus limitants dans le mécanisme de compétition.

## **MATERIELS ET METHODES**

### **Effet de l'application exogène des acides aminés sur l'activité antagoniste de la souche Ach1-1**

L'efficacité de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* a été évaluée sur les blessures de pomme comme décrit précédemment par Jijakli et Lepoivre, 1993, avec quelques modifications (Krimi Bencheqroun *et al.*, 2006). Des solutions ont été préparées en mélangeant la plupart des acides aminés connus pour être présents dans les tissus des pommes avec des concentrations 2, 10 ou 20 fois supérieures à celle rapportée pour les pommes (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001). Une heure après l'inoculation du pathogène, 40 µl de l'eau distillée ou de l'une des solutions des acides aminés ont été ajoutées aux blessures des pommes. Les témoins ont été traités avec les mêmes solutions en absence de la souche Ach1-1. Les diamètres des lésions ont été mesurés après 5 jours d'incubation à 25°C à l'obscurité. Le niveau de protection a été calculé selon la formule :  $(Dté-Dtr)/Dté \times 100$ , avec Dté et Dtr représentant respectivement les diamètres de lésion des pommes témoins et des pommes traitées.

### **Analyse par chromatographie de l'assimilation des acides aminés des pommes par l'antagoniste et/ou le pathogène**

Les pommes blessées ont été réparties selon quatre modalités (10 pommes/objet) : (1) pommes non traitées (témoins), (2): pommes traitées avec la souche Ach1-1 seule (antagoniste), (3) pommes traitées avec *P. expansum* seul (pathogène) (4) pommes traitées avec la souche Ach1-1 suivis par l'inoculation de *P. expansum* (antagoniste + pathogène). Les deux microorganismes ont été utilisés en suivant la méthodologie des essais de protection. Pour chaque objet, 50 µl du tampon PKT ont été ajoutés dans chaque blessure et ensuite récupérés par pipetage après 0, 6, 14 et 24 h de l'application de l'antagoniste. Les échantillons de chaque objet (30 échantillons) ont été mélangés et la concentration de chaque acide aminé existant a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse HPLC (High-pressure liquid chromatography) et détectée par fluorescence. Les échantillons ont été dérivés avec le 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ.Fluor) et séparés sur une colonne d'acide aminé (Water AccQ.Tag column) thermostatisée à 37°C. Les acides aminés ont été détectés par un détecteur fluorescent (Waters 2475) avec une longueur d'onde d'excitation de 250 nm et une longueur d'onde d'émission de 395 nm. L'identification des acides aminés a

été confirmée par comparaison de leur temps de rétention avec celui de standards (Sigma Chemical Co.).

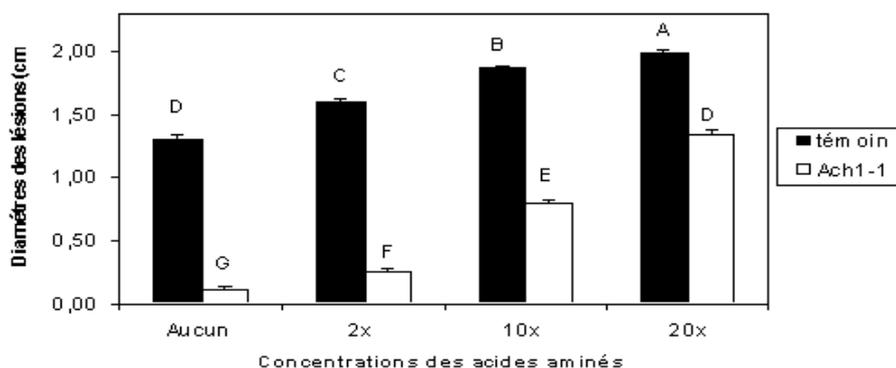
### Compétition pour des acides aminés spécifiques

Afin de trouver l'élément le plus limitant dans la compétition pour la nutrition, les acides aminés appartenant au groupe 1 (voir partie résultat) ont été évalués individuellement dans les essais de protection sur les blessures de pommes. Ainsi chacun de ces acides aminés (sérine, glycine et acide glutamique) a été appliqué dans les blessures, comme précédemment avec une concentration 20 fois supérieures à celles rapportées pour les tissus des pommes (USDA nutrient database for standard reference, release 14, 2001).

## RESULTATS

### Effet de l'application exogène des acides aminés sur l'activité antagoniste de la souche Ach1-1

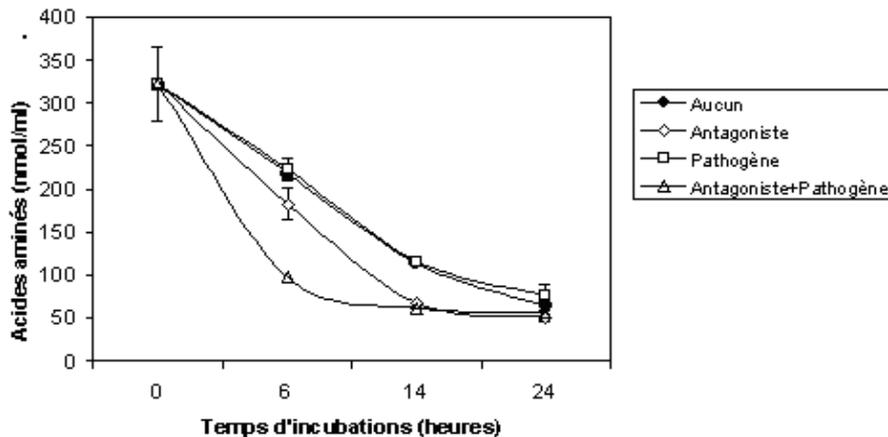
En générale, pour les blessures traitées avec la souche Ach1-1 ou pour celles non traitées (témoins) le diamètre des lésions développées par *P. expansum* a significativement augmenté avec l'augmentation de la concentration des acides aminés ajoutés (Graphe 1). L'application de la souche Ach1-1 a significativement réduit le diamètre de l'infection par rapport au témoin quelque soit la concentration en acides aminés. Cependant, l'importance de cette réduction a diminué avec l'augmentation de la concentration des acides aminés, s'accompagnant donc d'une perte du niveau de protection de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum*. La plus importante perte a été obtenue avec l'application de la concentration la plus élevée des acides aminés 20x. Ainsi par rapport à leur témoin respectif, 32,8% de protection a été enregistré lors de l'application de la concentration 20 x en acides aminés contre 91% qui a été obtenue sans ajout d'acides aminés (Graphique 1).



**Graphique 1 :** Effet de l'application exogène des acides aminés dans les blessures des pommes sur le diamètre des lésions (cm) causées par *P. expansum* en absence (témoin) ou en présence de la souche antagoniste (Ach1-1) après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent l'erreur standard. (n = 45). Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ )

### Analyse par chromatographie de l'assimilation des acides aminés des pommes par l'antagoniste et/ou le pathogène

L'analyse par HPLC de la cinétique des acides aminés existants dans les blessures des pommes a indiqué que la concentration totale de ces composés diminue durant l'incubation des pommes, essentiellement durant les premières 14 h suivant l'application de l'antagoniste Ach1-1 (Graphique 2). La plus importante réduction a été observée dans les blessures traitées avec la souche Ach1-1 et essentiellement dans celles contenant la souche Ach1-1 et *P. expansum*.

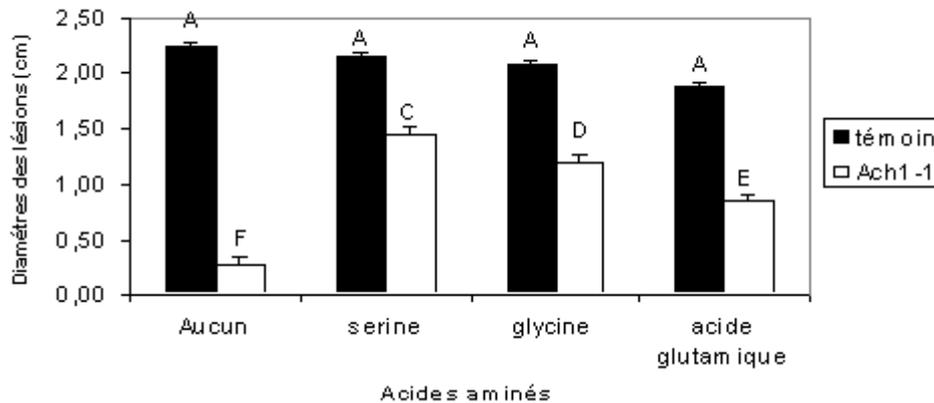


**Graphique 2 :** Concentration (nmol /ml) de l'ensemble des acides aminés présents dans les blessures des pommes durant les premiers 24 h d'incubation. Les blessures étaient intactes (Aucun), ou traitées avec la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* seule (Antagoniste), ou inoculées avec *P. expansum* seul (Pathogène) ou traitées avec la souche Ach1-1 et ensuite inoculées avec *P. expansum* (Antagoniste + Pathogène). Les barres verticales représentent l'E.S. (n=2).

L'analyse détaillée des données obtenues a permis de classer les différents acides aminés analysés en trois groupes selon le changement de leur concentration individuelle, durant l'incubation. Le premier groupe comprenait la serine, la glycine et l'acide glutamique dont les concentrations ont largement diminué avec le temps d'incubation. Le second groupe se composait des acides aminés suivants : acide aspartique, histidine, arginine, thréonine, alanine et proline, dont les concentrations restaient presque inchangées durant l'incubation. Le reste des acides aminés analysés (tyrosine, valine, méthionine, lysine, leucine, tryptophane et phénylalanine) qui existaient en très faibles concentrations ont constitué le troisième groupe (données détaillées non présentées).

### Compétition pour des acides aminés spécifiques

L'application individuelle de la serine, glycine ou l'acide glutamique n'a pas affecté les diamètres des lésions causés par *P. expansum* en absence de la souche Ach1-1 (Graphique 3). L'application de la souche antagoniste Ach1-1 a significativement réduit le développement du pathogène sur les blessures par rapport au témoin en présence ou en absence des acides aminés. Cependant l'importance de cette réduction a été significativement influencée par le type d'acide aminé ajouté. La plus importante perte de protection a été obtenue en appliquant l'acide aminé serine (32,7% de protection).



**Graphique 3 :** Effet de l'application exogène des acides aminés serine, glycine et acide glutamique dans les blessures des pommes sur les diamètres des lésions (cm) causés par *P. expansum* en absence (témoin) ou en présence de *A. pullulans* (Ach1-1) après 5 jours d'incubation. Les barres verticales représentent E.S (n=45). Les traitements suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents ( $P \leq 0,05$ )

## DISCUSSION

*A. pullulans* souche Ach1-1 est un nouvel agent de contrôle biologique de la pourriture bleue des pommes en conservation. Il a été sélectionné pour son niveau élevé de protection vis-à-vis de *P. expansum* sur les pommes blessées (Achbani et al., 2005). Dans le présent travail, la capacité de la souche Ach1-1 à contrôler le développement de *P. expansum* a été confirmée dans plusieurs essais en obtenant des niveaux de protection allant de 83 à 99% selon les essais (données non présentés). La compréhension des mécanismes d'action de la souche Ach1-1 est une étape nécessaire afin de maximiser le potentiel de son utilisation dans le contrôle de la pourriture bleue des pommes en post-récolte.

Une étude antérieure menée dans les conditions *in vitro* et *in situ* a prouvé que l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 d'*A. pullulans* se base essentiellement sur le mécanisme de la compétition pour la nutrition et particulièrement pour les acides aminés (Krimi Bencheqroun et al., 2006). Le présent travail a montré que l'application exogène des acides aminés à des concentrations croissantes dans les blessures des pommes a significativement réduit l'activité antagoniste de la souche Ach1-1 vis-à-vis de *P. expansum* sans affecter le développement de ces microorganismes (Graphique 1). En effet, l'ajout dans les blessures de la concentration la plus élevée des acides aminés (20x) a réduit le niveau de protection de 64%, indiquant ainsi que plus la source d'azote est importante dans les sites de compétition plus il y a une suppression de l'effet antagoniste de la souche Ach1-1. Cette observation suggère que la compétition et plus particulièrement celle pour les acides aminés peut jouer un rôle important dans le contrôle de *P. expansum*. Ce phénomène a été confirmé par l'analyse de la cinétique de l'épuisement des acides aminés des blessures durant l'incubation des pommes. Cette analyse a dévoilé que la concentration des acides aminés se trouve plus réduite, après l'incubation, en présence de la souche Ach1-1 qu'en présence de *P. expansum* et que l'épuisement le plus rapide des acides aminés a été obtenu en présence des deux microorganismes (Graphique 2). Ceci suggère que la souche Ach1-1 assimile les acides aminés des pommes mieux que *P. expansum*, et plus en particulier la serine, la glycine et l'acide glutamique. La serine et l'acide glutamique ont été trouvés parmi les trois principales acides aminés présents dans le jus de pomme qui ont été complètement assimilés durant 24 h d'incubation par une autre souche d'*A. pullulans* (ST1-A24) *in vitro* (Janisiewicz et al., 2000).

Ainsi ces acides aminés peuvent être plus impliqués que les autres acides aminés dans le mécanisme de compétition. En effet, leur application individuellement (Graphique 3) à de grandes concentrations dans les blessures des pommes a fortement réduit l'activité antagoniste de la souche Ach1-1, ce qui indique que ces acides aminés, et particulièrement la serine, paraient être parmi les éléments les plus limitants dans cette compétition.

En conclusion, ce travail a permis de révéler que la compétition pour les nutriments des pommes, et particulièrement pour les acides aminés, est l'un des principaux mécanismes impliqués dans l'activité de biocontrôle d'*A. pullulans* souche Ach1-1 vis à vis de *P. expansum* sur pomme en post-récolte. Parmi ces acides aminés, la sérine et la glycine sont les éléments les plus limitants dans cette compétition.

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

## REMERCIEMENT

Ce travail a été financé par DGCD-CUD (Direction Générale de la Coopération au Développement- Commission Universitaire pour le Développement) dans le cadre du projet PIC- Maroc (Projet Interuniversitaire Ciblé). Les auteurs remercient l'Unité de Bio Technologie (Belgique) pour sa collaboration dans la réalisation des analyses par HPLC.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achbani E.H., Mounir R., El Jaafari S., Douira A., Benbouazza A. and Jijakli M.H. (2005). Selection of antagonists of postharvest apple parasites: *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Comm. App. Biol. Sci, Ghent University*, 70/3, 5 143-149.
- Fravel, D.R., (2005). Commercialisation and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359.
- Janisiewicz W.J., Tworowski T.J., and Sharer C. (2000). Characterising the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90 (11), 1196-1200.
- Jijakli, M.H., Lepoivre, P. (1993). Biological control of postharvest *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on apples. *IOBC/WPRS Bull.* 16, 106–110.
- Krimi Bencheqroun, S., Bajji, M., Massart, S., Bentata, F., Labhilili, M., Achbani, H., El Jaafari, S. & Jijakli, M.H. (2006). Biocontrol of blue mold on apple fruits by *Aureobasidium pullulans* (strain Ach1-1): *in vitro* and *in situ* evidence for the possible involvement of competition for nutrients. *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, 71/3b, 1151- 1157.
- Krimi Bencheqroun S., Bajji M., Massart S., Labhilili M., El Jaafari S. and Jijakli M.H.. (2007). *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biol Technol.* 46, 128- 135.

- Massart, S, Jijakli M.H. (2007). Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review *Journal of Microbiological Methods*. 69 (2), 229-241
- Punja, Z., Utkhede, R., (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* 21, 400–407.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 185–194.