



HAL
open science

Développement d'une méthode de traçage mixte pour Aureobasidium pullulans souche Ach 1-1 et souche 1113-5, deux agents antagonistes des maladies fongiques des pommes en conservation

Adil El Hamouchi

► **To cite this version:**

Adil El Hamouchi. Développement d'une méthode de traçage mixte pour Aureobasidium pullulans souche Ach 1-1 et souche 1113-5, deux agents antagonistes des maladies fongiques des pommes en conservation. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences de Meknès, Morocco 2011. Français. NNT: . tel-01298076

HAL Id: tel-01298076

<https://theses.hal.science/tel-01298076>

Submitted on 5 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Public Domain Mark 4.0 International License



**UNIVERSITÉ MOULAY ISMAIL
FACULTÉ DES SCIENCES
MEKNÈS**



THÈSE

Présentée pour obtenir

Le grade de Docteur en Biologie

Spécialité : Biologie Moléculaire

Par

Adil EL HAMOUCHI

Développement d'une méthode de traçage mixte pour
Aureobasidium pullulans souche Ach 1-1 et souche 1113-5,
deux agents antagonistes des maladies fongiques des
pommes en conservation

Soutenue publiquement le 19 Novembre 2011 devant le jury composé de :

Mr. S. EL JAAFARI

Professeur, Faculté des Sciences, Meknès

Président et Directeur de thèse

Mr. M. EL HASSOUNI

Professeur, Faculté des Sciences D.M., Fès

Rapporteur

Mme. N. EL GHACHTOULI

Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Fès

Rapporteur

Mr. M.E. MOUMNI

Professeur, Faculté des Sciences, Meknès

Examineur

Mr. E.H. ACHBANI

Directeur de Recherches, Institut National de la Recherche Agronomique, Meknès

Examineur

Dédicaces

À mes très chers parents :
Fatiha BENSYAED et Mohammed EL HAMOUCHI
Pour tout votre amour et vos sacrifices
Pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis
Pour votre soutien et votre stimulante fierté
Tous les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments
et la reconnaissance que je vous porte.
Qu'Allah vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

À Tareq, mon petit frère,
en témoignage de notre solide fraternité.
Qu'Allah t'accorde succès et bonheur.

À mes grands-mères :
Fatima HMAISSOU et Fatima AKIDAR,
source d'amour et d'affection inépuisable.
Qu'Allah vous protège et vous donne longue vie.

À la mémoire de mes grands-pères :
Moulay Essayed BENSAYED et Allal EL HAMOUCHI.
Qu'Allah vous accorde sa miséricorde.

Remerciements

Qu'il me soit permis de présenter ici mes remerciements à tout un petit monde de personnes qui ont rendu possible le présent travail de thèse et qui ont contribué à son élaboration sous quelque forme que ce soit.

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers le directeur de cette thèse Monsieur le Professeur **Samir EL JAAFARI**. Il s'y est grandement impliqué par ses remarques et suggestions, mais aussi par ses encouragements dans les moments clés de son élaboration. Je tiens à le remercier aussi pour la confiance qu'il m'a accordé dès le début, ainsi que pour cette liberté qu'il a permise, sans laquelle le chercheur ne saurait affirmer sa manière de penser et de procéder.*

*J'adresse également mes plus vifs remerciements et mon grand respect à Monsieur **El Hassane ACHBANI**, directeur de recherche à l'INRA de Meknès, pour son aide précieuse et ses conseils pertinents. Je le remercie aussi de m'avoir donné accès libre à son laboratoire et pour son intérêt continu et assidu à l'égard de mes travaux de recherche. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude et de ma grande estime.*

*Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **M.H. JIJAKLI**, Professeur à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche (Unité de Phytopathologie), pour son encadrement attentionné et sa grande disponibilité. Ses conseils scientifiques avisés et ses remarques pertinentes m'ont été d'une aide précieuse.*

*Je saisis aussi cette occasion pour prononcer un mot de gratitude à l'égard de l'âme du feu Professeur **Bouchra NAJIMI**, pour ses qualités scientifiques, pédagogiques, mais surtout humaines. Merci d'avoir guidé mes premiers pas dans le chemin de la recherche scientifique et plus particulièrement en biologie moléculaire. Puisse Allah, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*

Je ne manquerais pas non plus de dire un grand merci aux membres du jury qui ont accepté, sans aucune réserve, d'évaluer cette thèse à sa juste valeur, et de me faire part de leurs

remarques sûrement pertinentes qui, avec un peu de recul, contribueront, sans nul doute, au perfectionnement du présent travail.

Mes remerciements s'étendent également à mes amis et collègues membres de l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, j'ai nommé Damien FRIEL, Mohammed BAJJI, Gladysse RUFFLARD, Frédéric DRESEN, Angelo LOCICERO, Paulette VERRA, Ludivine LASSOIS, Imane FEKIH HASSAN, Sanaa KRIMI BENCHEQROUN, Coralie MISSON, Sylvie VAN MELLAERT et Rachid LAHLALI. Je les remercie tous pour l'efficacité de leur aide, pour les riches échanges, et pour l'atmosphère de travail conviviale et si agréable.

Une mention toute particulière est également accordée à l'amitié sincère et désintéressée d'Abderrafiq LAGMIRI, Laetitia MASQUELIER, Frédéric VAN ESTINE, Marie VAN DER MOLLEN et Ellen BULLEN. Merci pour toutes les fêtes, pour toutes les invitations et les bons moments de détente qui étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles de solitude et qui m'ont permis de relativiser mes difficultés et de persévérer dans mes recherches durant mes séjours en Belgique.

J'adresse mes remerciements également à Abdelatif BENBOAZZA, technicien à l'INRA de Meknès, pour sa disponibilité et sa sympathie durant la réalisation de mes travaux de recherche au sein de l'INRA de Meknès.

Et j'en viens à ma famille, à ma mère et mon père, à ceux qui sont toujours présents et continuent de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour s'être sacrifiés pour que vos enfants grandissent et prospèrent. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de l'âge, de la santé, de la vie, au bien-être de vos enfants. Enfin ! Merci tout simplement d'être... mes parents. Merci aussi à mon frère, à l'unique frère que j'ai au monde, Tareq. Merci d'être toujours à mes côtés pour donner du goût et du sens à notre vie de famille.

*Ce travail de thèse a été financé par la **DGCD-CUD** (Direction Générale de la Coopération au Développement-Commission Universitaire pour le développement - Belgique) que je souhaite remercier pour m'avoir octroyé une bourse durant mes séjours en Belgique. Il a aussi bénéficié d'une bourse d'excellence (a11/05) durant 3 ans (2005/2007) de la part du **CNRST** (Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique - Maroc).*

Enfin, j'espère du fond du coeur que tout ce petit monde, trouve ici un mot de reconnaissance, et que chacun se reconnaisse en ce qui le concerne. J'espère aussi que l'effort déployé dans le présent travail réponde aux attentes des uns et des autres.

Publications et communications

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont contribué aux publications et aux communications suivantes :

Publications

Adil El Hamouchi, Mohammed Bajji, Damien Friel, Bouchra Najimi, El Hassan Achbani, Samir El Jaafari, Alain Durieux, M. Haïssam Jijakli, (2008). Development of SCAR markers and a semi-selective medium for the quantification of strains Ach 1-1 and 1113-5, two *Aureobasidium pullulans* potential biocontrol agents. *Postharvest Biology and Technology*. 50, 216–223.

Adil El Hamouchi, Bouchra Najimi, Samir El Jaafari, Damien Friel, M. Haïssam Jijakli, (2007). Development of a RAPD marker and a semi-selective medium for *Aureobasidium pullulans* (strain Ach 1-1), a biocontrol agent against post-harvest diseases on apples. *IOBC/WRPS Bulletin* Vol. 30(6), 485-489.

Communication affichée

Adil El Hamouchi, Bouchra Najimi, Samir El Jaafari, Damien Friel, M. Haïssam Jijakli, (2006). Development of a RAPD marker and a semi-selective medium for *Aureobasidium pullulans* (strain Ach 1-1), a biocontrol agent against post-harvest diseases on apples. IXth meeting of the “phytopathogens” group: Fundamental and practical approaches to increase biocontrol efficacy. September 6 – 10. *Spa, Belgium*.

Communications orales

Adil El Hamouchi, Bouchra Najimi, M. Haïssam Jijakli, Samir El Jaafari, (2005). Traçage des microorganismes antagonistes : Revue bibliographique et approche méthodologique. Le 1^{er} meeting du programme "**lutte biologique contre les maladies de post-récolte des agrumes et des pommes**". Programme interuniversitaire ciblé de la coopération universitaire pour le développement Belgique-Maroc. Le 10 Octobre, INRA de Meknès.

Adil El Hamouchi, M. Haïssam Jijakli, Samir El Jaafari, (2006). Identification de marqueurs moléculaires RAPD et mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour *Aureobasidium pullulans* souches Ach 1-1 et 1113-5, deux agents de biocontrôle des maladies fongiques des pommes en conservation. Le 2^{ème} meeting du programme "**lutte biologique contre les maladies de post-récolte des agrumes et des pommes**". Programme interuniversitaire ciblé de la coopération universitaire pour le développement Belgique-Maroc. Le 7 Novembre, INRA de Meknès.

Adil El Hamouchi, M. Haïssam Jijakli, Samir El Jaafari, (2007). Développement d'une méthode de traçage mixte pour *Aureobasidium pullulans* souches Ach 1-1 et 1113-5, deux agents de biocontrôle des maladies fongiques des pommes en conservation. Le 3^{ème} meeting du programme "**lutte biologique contre les maladies de post-récolte des agrumes et des pommes**". Programme interuniversitaire ciblé de la coopération universitaire pour le développement Belgique-Maroc. Le 21 Novembre, INRA de Meknès.

Résumé

Aureobasidium pullulans souche Ach 1-1 et souche 1113-5 sont deux agents de biocontrôle efficaces contre *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*, respectivement responsables de la pourriture grise et bleue des pommes en conservation. Dans le présent travail, un système de traçage permettant d'identifier spécifiquement nos deux souches antagonistes et de les quantifier parmi la microflore naturellement présente à la surface des fruits a été développé. La méthodologie utilisée consistait au développement de marqueurs moléculaires spécifiques pour nos deux souches étudiées et d'un milieu de culture semi-sélectif permettant de faciliter l'isolement et le comptage des colonies des souches Ach 1-1 et 1113-5.

La technique de marquage moléculaire RAPD a été appliquée sur une collection de 15 souches d'*A. pullulans*, y compris les souches Ach 1-1 et 1113-5. Cette technique nous a permis d'identifier cinq fragments RAPD spécifiques chez la souche Ach 1-1 et trois autres chez la souche 1113-5. Parmi eux, un fragment de 528 pb spécifique à la souche Ach 1-1 (généralisé avec l'amorce RAPD OPR-13) et un autre de 431 pb spécifique à la souche 1113-5 (amplifié avec l'amorce RAPD OPQ-03) ont été sélectionnés, clonés et séquencés. Leurs séquences nous ont servi de base pour concevoir des amorces SCAR. Quatre couples d'amorces SCAR ont été sélectionnés pour leur capacité à générer des marqueurs SCAR : trois spécifiques à la souche Ach 1-1 (157 pb, 190 pb et 388 pb) et un spécifique à la souche 1113-5 (431 pb). Ces amorces SCAR peuvent identifier de façon spécifique les souches Ach 1-1 et 1113-5 parmi une collection de 14 souches d'*A. pullulans* et huit autres souches de levures communément présentes à la surface de pommes. La sélectivité de nos amorces SCAR a été aussi testée sur de l'ADN extrait à partir de la microflore épiphytique des pommes.

Comme milieu de culture semi-sélectif, le milieu PDA amendé avec 0,5 mg/L d'Euparen, 1 mg/L de Sumico, 2,5 mg/L d'Hygromycine B, 30 mg/L de Streptomycine sulfate et 1 mg/L de Cycloheximide a été sélectionné. Ce milieu a permis l'inhibition totale du développement de la microflore de l'air et paraît très toxique vis-à-vis de la microflore épiphytique de la surface des pommes.

La combinaison entre la technique d'étalement sur un milieu de culture semi-sélectif et l'identification des colonies par amplification PCR des marqueurs SCAR de 190 pb et de 431 pb, respectivement spécifiques aux souches Ach 1-1 et 1113-5, nous a fourni un outil de traçage plus précis pour étudier la dynamique des populations de ces deux agents de biocontrôle à la surface de pommes en condition de conservation en chambre froide.

L'utilisation de cette procédure de traçage mixte nous a permis de mettre en évidence une densité de population de $1,43 \times 10^4$ ufc/cm² et de $1,47 \times 10^4$ ufc/cm² respectivement pour la souche Ach 1-1 et 1113-5, deux heures après leur application sur pommes avec une concentration de 10^7 ufc/mL. Après deux mois de stockage à 4°C, ces deux populations ont chuté de 58% et 66 % respectivement pour la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5. Cette technique nous a également permis de montrer que la population naturelle en *A. pullulans* à la surface des pommes représentait 1% du nombre d'*A. pullulans* récupérées à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 et 8% dans le cas de la souche 1113-5.

Abstract

Aureobasidium pullulans strains Ach 1-1 and 1113-5 are two efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on stored apples. In the present work, a monitoring system allowing their identification and quantification has been developed. The used methodology consisted in the development of specific molecular markers for both strains and a semi-selective medium which facilitate the isolation and counting colonies of strains Ach 1-1 and 1113-5. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique has been applied to a collection of 15 strains of *A. pullulans*, including the Ach 1-1 and 1113-5 strains. Five specific RAPD fragments have been amplified for strain Ach 1-1 and three others for strain 1113-5. Among them, a fragment of 528 bp specific to strain Ach 1-1 (generated with the OPR-13 RAPD primer) and another one of 431 bp specific to strain 1113-5 (amplified with the OPQ-03 RAPD primer) have been selected, cloned, sequenced, and used to design sequence-characterized amplified region (SCAR) primers. Four different SCAR markers have been amplified: three specific to strain Ach 1-1 (157 bp, 190 bp and 388 bp) and one specific to strain 1113-5 (431 bp). These SCAR primers can clearly identify strains Ach 1-1 and 1113-5 among 14 strains of *A. pullulans* and among eight yeast strains commonly present on the surface of apples. Their selectivity has been also tested using DNA extracted from epiphytic microflora of the apple surface.

As a semi-selective medium, the PDA medium supplemented with 0.5 mg/L Euparen, 1mg/L Sumico, 2.5 mg/L Hygromycin B, 30 mg/L Streptomycin sulphate, and 1 mg/L Cycloheximide has been selected. This medium inhibited the development of the air microflora and appeared highly toxic for the epiphytic microflora of apple surface without altering the growth of the targeted strains Ach 1-1 and 1113-5.

The combination of the plating technique on semi-selective medium and the identification of the colonies by PCR amplification of SCAR markers of 190 bp and 431 bp, respectively specific to *A. pullulans* strain Ach 1-1 and strain 1113-5, provides a valuable monitoring tool to specifically identify and quantify our targets strains. This monitoring tool has been used to evaluate their population dynamics on apple surface under cold storage conditions. Using this mixed monitoring method, we have highlighted that the population density of strain Ach 1-1 and strain 1113-5 on apple surface has been respectively 1.43×10^4 ufc/cm² and 1.47×10^4 ufc/cm², two hours after their application on apples at the concentration of 10^7 ufc/mL. After two months storage at 4°C, these two populations densities were reduced by 58% and 66% respectively for the strain Ach 1-1 and strain 1113-5. This technique allowed also to demonstrate that the natural population of *A. pullulans* on apples surface represented 1% of the number of *A. pullulans* recovered on apples treated by strain Ach 1-1 and 8% in the case of strain 1113-5.

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
rDNA	ADN ribosomal
ARN	Acide ribonucléique
tRNA	ARN de transfert
C	Cytosine
dNTPs	Desoxynucleotides triphosphate
G	Guanine
T	Thymine
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST	Basic local alignment search tool
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PCR	Repetitive Extragenetic Palindromic – PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
DO	Densité optique
DL₅₀	Dose létale 50
g	Gravité (accélération de centrifugation)
ha	Hectares
Kb	Kilobase
µL	Microlitre
min	Minute
M	Molaire
µM	Micromolaire
ng	Nanogramme
b	Bases
pb	Paire de bases
qt	Quintaux
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
U	Unité enzymatique
ufc	Unité formatrice de colonie
mA	Milliampère
UV	Ultraviolet
V/V	Volume/volume
°C	Degré Celsius
T_m	Température de fusion
EDTA	Ethyl Diamine Tétracétyle
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris - Borate- EDTA
TE	Tris - EDTA
PDA	Potatose dextrose agar
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
NZY	N-Z amine Yeast Extract

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	- 1 -
Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 7 -
1. LA POMICULTURE.....	- 8 -
1.1. Importance économique.....	- 8 -
1.2. Les maladies fongiques des pommes en conservation.....	- 10 -
1.2.1. Les parasites de blessures.....	- 10 -
1.2.2. Les parasites latents.....	- 11 -
1.3. Moyens de lutte contre les maladies de post-récolte.....	- 11 -
1.3.1. Mesures préventives.....	- 11 -
1.3.1.1. Au verger.....	- 11 -
1.3.1.2. Au niveau des stations de conservation.....	- 12 -
1.3.2. La lutte chimique.....	- 12 -
1.3.3. La lutte biologique.....	- 13 -
2. ÉTAPES DU DEVELOPPEMENT D'UN BIOPESTICIDE.....	- 16 -
2.1. Isolement et sélection des antagonistes.....	- 16 -
2.2. Production en masse et formulation.....	- 17 -
2.3. Modes d'action.....	- 19 -
2.4. Procédures d'homologation.....	- 20 -
2.5. Écologie et traçage des agents de lutte biologique.....	- 21 -
3. MÉTHODES DE TRAÇAGE DES MICROORGANISMES APPLIQUÉS EN LUTTE	
BIOLOGIQUE.....	- 22 -
3.1. Méthodes de traçage microbiologiques.....	- 24 -
3.1.1. Techniques d'identification microbiologiques.....	- 24 -
3.1.2. Techniques de quantification microbiologiques.....	- 24 -
3.2. Méthodes de traçage directes.....	- 26 -
3.2.1. Techniques d'identification directes.....	- 26 -
3.2.2. Techniques de Quantification Directes.....	- 27 -
3.3. Méthodes de traçage moléculaires.....	- 28 -
3.3.1. Techniques d'identification moléculaires.....	- 28 -
3.3.1.1. Le marquage par la technique RFLP.....	- 29 -
3.3.1.2. Le marquage par la technique PFGE.....	- 31 -
3.3.1.3. Le marquage par la technique AFLP.....	- 33 -
3.3.1.4. Le marquage par la technique Rep-PCR.....	- 36 -
3.3.1.5. Le marquage par la technique RAPD.....	- 37 -
3.3.2. Techniques de quantification par PCR.....	- 41 -
3.3.2.1. La cinétique de la réaction PCR.....	- 41 -
3.3.2.2. La PCR quantitative.....	- 42 -
3.4. Méthodes de traçage mixtes.....	- 45 -
3.5. Conclusion.....	- 48 -
4. AUREOBASIDIUM PULLULANS.....	- 49 -
4.1. Présentation de l'espèce.....	- 49 -
4.2. Caractères cultureux.....	- 50 -
4.3. Morphologie microscopique.....	- 50 -
4.4. Utilisation d' <i>A. pullulans</i> en lutte biologique.....	- 53 -
4.5. Mécanismes d'action des souches antagonistes d' <i>A. pullulans</i>	- 55 -
4.6. Production en masse et formulation d' <i>A. pullulans</i> souche Ach 1-1.....	- 55 -
5. CONCLUSION.....	- 56 -

Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES..... - 59 -

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE..... - 60 -

- 1.1. Souches de levures et conditions de culture..... - 60 -
- 1.2. Matériel végétal..... - 60 -

2. MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES - 62 -

- 2.1. Récupération des microorganismes par lavage de la surface des pommes..... - 62 -
- 2.2. Préparation des suspensions des souches Ach 1-1 et 1113-5..... - 62 -
- 2.3. Développement d'un milieu de culture semi-sélectif..... - 63 -
 - 2.3.1. Premier criblage des fongicides et antibiotiques..... - 63 -
 - 2.3.2. Combinaison des matières actives..... - 64 -
 - 2.3.3. Évaluation de la sélectivité des milieux..... - 64 -

3. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE - 65 -

- 3.1. Extraction de l'ADN génomique des levures..... - 65 -
- 3.2. Extraction d'ADN de la microflore épiphytique des pommes..... - 66 -
- 3.3. Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN extrait..... - 66 -
- 3.4. Marquage moléculaire par RAPD..... - 67 -
 - 3.4.1. Principe de la RAPD..... - 67 -
 - 3.4.2. Choix et sélection des amorces..... - 67 -
 - 3.4.3. Conditions d'amplification PCR pour la RAPD..... - 68 -
 - 3.4.4. Analyse des produits d'amplification..... - 68 -
- 3.5. Conversion des marqueurs RAPD en marqueurs SCAR..... - 69 -
 - 3.5.1. Elution des bandes spécifiques à partir du gel d'agarose..... - 69 -
 - 3.5.2. Clonage moléculaire des bandes spécifiques..... - 69 -
 - 3.5.2.1. Ligation des fragments au vecteur pCR[®] 2.1..... - 69 -
 - 3.5.2.2. Transformation des cellules compétentes..... - 70 -
 - 3.5.2.3. Sélection des colonies recombinantes..... - 70 -
 - 3.5.3. Purification des ADN plasmidiques recombinants (minipréparation)..... - 70 -
 - 3.5.4. Séquençage des fragments et analyse bioinformatique..... - 71 -
 - 3.5.5. Choix et conception des amorces SCAR..... - 72 -
 - 3.5.6. Évaluation de la spécificité des couples d'amorces SCAR..... - 72 -

**4. ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES POPULATIONS DES SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5
SUR POMMES EN CONSERVATION : TRAÇAGE MIXTE - 73 -**

- 4.1. Réalisation des traitements..... - 73 -
- 4.2. Récupération et quantification des levures présentes à la surface des pommes..... - 73 -
- 4.3. Identification des colonies par PCR..... - 74 -

5. ANALYSES STATISTIQUES DES RÉSULTATS..... - 75 -

Chapitre III : RÉSULTATS - 76 -

1. MISE AU POINT DU MILIEU SEMI-SÉLECTIF..... - 77 -

- 1.1. Résultats du premier criblage des fongicides et antibiotiques..... - 77 -
- 1.2. Résultats des combinaisons des fongicides et des antibiotiques..... - 79 -

2. EXTRACTION DE L'ADN - 82 -

3. SÉLECTION DE MARQUEURS RAPD..... - 82 -

- 3.1. Marqueurs RAPD relatifs à la souche Ach 1-1..... - 82 -
- 3.2. Marqueurs RAPD relatifs à la souche 1113-5..... - 89 -

4. CONVERSION DE MARQUEURS RAPD EN MARQUEURS SCAR - 93 -

4.1. Purification et Clonage des marqueurs RAPD.....	- 93 -
4.2. Séquençage et conception d'amorces SCAR.....	- 95 -
4.3. Vérification de la spécificité des couples d'amorces SCAR.....	- 98 -
4.3.1. Sélection d'amorces SCAR relatifs à la souche Ach 1-1.....	- 98 -
4.3.1.1. Comparaison des séquences par alignement et conception de nouvelles amorces SCAR.....	- 106 -
4.3.1.2. Vérification de la spécificité des nouveaux couples d'amorces SCAR.....	- 109 -
4.3.2. Sélection d'amorces SCAR relatifs à la souche 1113-5.....	- 111 -
5. TRAÇAGE DES SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5 À LA SURFACE DES POMMES...	- 113 -
Chapitre IV : DISCUSSION.....	- 117 -
1. DÉVELOPPEMENT DU MILIEU SEMI-SÉLECTIF.....	- 119 -
2. IDENTIFICATION DE MARQUEURS RAPD SPÉCIFIQUES AUX SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5.....	- 122 -
3. CONVERSION DE MARQUEURS RAPD EN MARQUEURS SCAR.....	- 123 -
4. TRAÇAGE DES SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5 À LA SURFACE DES POMMES EN COURS DE CONSERVATION.....	- 126 -
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	- 129 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 134 -
ANNEXES.....	- 150 -
APPENDICES.....	- 158 -

Liste des tableaux

Tableau 1 : Superficie et production des pommes dans la région de Meknès-Tafilalet.....	- 9 -
Tableau 2 : Exemples d'antagonistes microbiens des maladies de conservation des fruits.....	- 15 -
Tableau 3 : Niveau de discrimination taxonomique des techniques de marquage moléculaire	- 29 -
Tableau 4 : Exemples d'utilisation de la RAPD pour le développement de marqueurs SCAR	- 40 -
Tableau 5 : Exemples d'utilisation des techniques de traçage mixtes sur des agents de biocontrôle ...	- 47 -
Tableau 6 : Origines et sources des souches de levures utilisées.....	- 61 -
Tableau 7 : Concentration en fongicides et antibiotiques testés	- 63 -
Tableau 8 : Régime thermique de la réaction RAPD.....	- 68 -
Tableau 9 : Présentation des doses maximales de matières actives non toxiques pour la souche Ach 1-1 et des DL ₅₀ des fongicides vis-à-vis de <i>B. cinerea</i> et <i>Penicillium</i> sp.....	- 78 -
Tableau 10 : Taille et nombre des bandes spécifiques à la souche Ach 1-1 obtenues par les huit amorces pré-sélectionnées	- 83 -
Tableau 11 : Taille et nombre des bandes spécifiques à la souche Ach 1-1 obtenues par les cinq amorces retenues.....	- 85 -
Tableau 12 : Représentation des amorces pré-sélectionnées et des bandes spécifiquement amplifiées vis-à-vis de la souche 1113-5	- 89 -
Tableau 13 : Représentation des résultats d'amplification par les trois amorces retenues	- 91 -
Tableau 14 : Description des amorces SCAR conçues pour la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5...-	98 -
Tableau 15 : Position des amorces SCAR et taille des amplicons attendus chez la souche Ach 1-1....-	99 -
Tableau 16 : Position des nouvelles amorces SCAR et taille des amplicons attendus chez la souche Ach 1-1	- 109 -
Tableau 17 : Position des amorces SCAR et taille des produits attendus chez la souche 1113-5.....-	111 -

Listes des figures

Figure 1 : Production en milliers de tonnes des rosacées fruitières au Maroc .	- 9 -
Figure 2 : Principe de marquage moléculaire par la technique RFPL	- 31 -
Figure 3 : Principe de marquage moléculaire par la technique PFGE	- 33 -
Figure 4 : Principe de marquage moléculaire par la technique AFLP	- 35 -
Figure 5 : Principe de marquage moléculaire par la technique Rep-PCR	- 37 -
Figure 6 : Principe du marquage moléculaire par la technique RAPD	- 38 -
Figure 7 : Étapes de développement d'un marqueur SCAR à partir d'un marqueur RAPD	- 40 -
Figure 8 : Détermination de la quantité initiale de séquence cible (N_0)	- 43 -
Figure 9 : Culture d' <i>A. pullulans</i> souche Ach 1-1 et souche 1113-5 sur milieu PDA	- 52 -
Figure 10 : Morphologie microscopique d' <i>A. pullulans</i> CBS 584.75	- 52 -
Figure 11 : Test de toxicité et de sélectivité du milieu semi-sélectif S_{18}	- 81 -
Figure 12 : Test de toxicité et de sélectivité du milieu semi-sélectif S_{32}	- 81 -
Figure 13 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPO-11 et OPP-01	- 83 -
Figure 14 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPQ-04, OPR-13, OPS-01, OPT-01, OPQ-12, OPR-06, OPT-05 et OPT-17	- 84 -
Figure 15 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPQ-04, OPQ-12 et OPR-13 sur l'ADN génomique des 12 souches d' <i>Aureobasidium pullulans</i> testées.	- 87 -
Figure 16 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPT-01, OPT-17 sur l'ADN génomique des 12 souches d' <i>Aureobasidium pullulans</i> testées	- 88 -
Figure 17 : Profils RAPD obtenus avec les amorces, OPR-07, OPS-11, OPT-06, OPR-06, OPS-16, OPT-02, OPQ-03 et OPS-11	- 90 -
Figure 18 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPN-17, OPO-05 et OPQ-03 sur l'ADN génomique des souches d' <i>Aureobasidium pullulans</i> testées.	- 92 -
Figure 19 : Un exemple d'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose du résultat d'extraction et de purification de la bande de 525 pb générée avec l'amorce OPR-13 et de la bande de 430 pb amplifiée avec l'amorce OPQ-03.	- 94 -
Figure 20 : Un exemple d'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR réalisée avec les amorces T7 et M13 Reverse sur des miniprep de plasmides recombinants	- 94 -
Figure 21 : Séquences des marqueurs RAPD générés avec les amorces OPR-13 et OPQ-03	- 97 -
Figure 22 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification obtenus par PCR avec le couple d'amorce AR13.1/ AR13.2	- 103 -
Figure 23 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits obtenus par PCR avec les couples d'amorces AR13.3/AR13.4, AR13.1/AR13.4, AR13.2/AR13.3 et AR13.5/AR13.6	- 104 -

Figure 24 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification obtenus par PCR avec les couples d'amorces AR13.5/AR13.4, AR13.3/AR13.6 et AR13.5/AR13.2 sur l'ADN génomique des souches d' <i>Aureobasidium pullulans</i> étudiées.	- 105 -
Figure 25 : Séquences des bandes générées chez les souches Ach 1-1, Ach 2-1 et MUCL 20326 avec le couple d'amorces SCAR AR13.3/AR13.6	- 107 -
Figure 26 : Alignement des séquences amplifiées avec le couple d'amorce AR13.3/AR13.6 chez les souches Ach 1-1, Ach 2-1 et MUCL 20326	- 108 -
Figure 27 : Amplification PCR des trois marqueurs SCAR spécifiques à la souche Ach 1-1 par utilisations des couples d'amorces SCAR AR13.7/AR13.10, AR13.7/AR13.11 et AR13.9/AR13.11	- 110 -
Figure 28 : Amplification PCR du marqueur SCAR spécifique à la souche 1113-5 par utilisation du couple d'amorce AQ3.1/AQ3.2.....	- 112 -
Figure 29 : Dynamique de population d' <i>A. pullulans</i> à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 ou la souche 1113-5 et des pommes non traitées.....	- 115 -
Figure 30 : Exemple d'Analyse par PCR des colonies d' <i>A. pullulans</i> issues des eaux de lavage des pommes traitées avec la souche Ach 1-1	- 116 -
Figure 31 : Exemple d'Analyse par PCR des colonies d' <i>A. pullulans</i> issues des eaux de lavage des pommes traitées avec la souche 1113-5	- 116 -

INTRODUCTION

« Le commencement est la moitié de tout »
[Pythagore]

Les pommes représentent une part importante parmi les filières fruitières dans le monde, elles occupent la quatrième place (avec 60 millions de tonnes) de part leur volume de production. Sur le continent Africain, le Maroc occupe une position importante dans la production des pommes. Avec une production nationale annuelle en pommes estimée à plus de 400 000 tonnes, il contribue à raison de 30% de la production de ces fruits en Afrique, ce qui le place en seconde position après l'Afrique du Sud (MADRPM, 2007 ; FAO, 2007).

Les plantations de pommiers au Maroc se placent au 2^{ème} rang des rosacées après l'amandier. Ces plantations ont connu une évolution très importante durant la décennie 1982-1992, où les superficies ont triplé pour passer de 8 800 hectares à 26 000 hectares. Cette augmentation rapide des superficies est liée à la rentabilité élevée de la culture de pommier (MADRPM, 2007).

Toutefois, parmi les problèmes qui compromettent la rentabilité de ce secteur, figurent principalement les pourritures de post-récolte qui peuvent entraîner des pertes importantes pouvant atteindre 25 % de la récolte totale dans les pays développés, et ceci malgré les techniques modernes de conservation comme l'atmosphère contrôlée ou la conservation à bas taux d'oxygène (Pusey et Wilson, 1984). Cette proportion peut augmenter jusqu'à 50% dans les pays en voie de développement (Eckert et Ogawa, 1985 ; Janisiewicz et Korsten, 2002). En terme économique ces pertes sont plus élevées, que celles observées au champ, du fait que les coûts de récolte, de transport et de stockage s'additionnent au coût global de la production.

Dans la majorité des cas ces pertes sont occasionnées par trois espèces fongiques : *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* (parasites de blessure) et les *Gloeosporium* spp. (Parasites latents). Le premier groupe infecte les fruits via des blessures qui peuvent être occasionnées par des conditions climatiques défavorables avant récolte (grêle, vent violent...), ou lors de manipulations pendant la cueillette, le transport ou le triage. Le deuxième groupe est capable de pénétrer les fruits par les lenticelles. Le développement ultérieur des symptômes (pourriture du fruit) se produit lors de la phase de conservation.

Actuellement, le contrôle des maladies fongiques de conservation des fruits repose essentiellement sur des traitements fongicides qui sont appliqués en verger durant les semaines précédant la récolte, et/ou immédiatement après la cueillette. Cependant, l'inquiétude des consommateurs au sujet des résidus fongicides pouvant persister sur les fruits, l'apparition de souches phytopathogènes résistantes à certaines matières actives ou même à des familles de

fongicides (Francllet, 1994 ; Lima et *al.*, 2006), l'interdiction ou la limitation d'usage de certains fongicides (wellings, 1996), ont encouragé la recherche d'autres méthodes alternatives de contrôle, moins malfaisants à la santé humaine et plus respectueux à l'environnement.

Ces dernières années, comme alternative de lutte chimique, plusieurs laboratoires de recherches se penchent activement sur les moyens de lutte biologique qui visent à contrôler les agents pathogènes au moyen de ce qu'on appelle : **biopesticides** ou **agents de biocontrôle**, c'est-à-dire des moisissures, des levures, des bactéries et des virus (Wilson et Wisniewski, 1989 ; Roberts, 1990 ; Jijakli et Lepoivre, 1993). Ces méthodes alternatives de lutte sont perçues comme plus soucieuses de l'environnement et de la santé du consommateur, et répondent plus adéquatement aux aspirations de développement durable de l'agriculture.

Très souvent, l'utilisation d'antagonistes seuls pour la protection de cultures en plein champ ou en serre donne des niveaux de protection insatisfaisants comparés à ceux obtenus par l'emploi des fongicides. Les raisons de ces échecs, sont souvent liées à (1) l'inadéquation et/ou à des variations des conditions environnementales limitant l'efficacité des agents de lutte biologique, (2) à la difficulté de maintenir l'efficacité de l'antagoniste pendant une période suffisamment longue, et (3) au manque de compétitivité économique des agents de biocontrôle par rapport aux produits chimiques existants (Wilson et Wisniewski, 1989). A l'opposé, la conservation des fruits constitue un domaine où les limites de la lutte biologique pourraient être plus facilement surmontées, car les sites d'application sont limités aux fruits et ces derniers présentent une haute valeur ajoutée qui permet de supporter les coûts parfois élevés d'un traitement biologique (Fokkema, 1991). De plus, les paramètres environnementaux des chambres de stockage sont bien définis et stables au cours du temps.

Un succès considérable a été accompli par ces antagonistes microbiens capables de contrôler les maladies fongiques de conservation, et un grand nombre d'informations sur ce sujet est maintenant disponible dans la littérature (Wilson et Wisniewski, 1994 ; Janisiewicz et korsten, 2002 ; Montesinos, 2003 ; Droby et *al.*, 2009 ; Jijakli M.H., 2010 ; Spadaro et Gullino, 2010). Parmi ceux-ci, de nombreux antagonistes potentiellement capables de contrôler les pourritures de blessures de pommes dues à *B. cinerea* et/ou *P. expansum* ont été trouvés chez des **levures** : *Acremonium breve* (Janisiewicz, 1988) ; *Candida tenuis*, *Pichia guilliermondii* (Wilson et Wisniewski 1989) ; *Cryptococcus laurentii* (Roberts, 1990) ; *Candida guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* (McLaughlin et *al.*, 1992) ; *Pichia anomala* (Jijakli et Lepoivre., 1993) ;

Sporobolomyces roseus (Janisiewicz et al., 1994) ; *Candida oleophila* (Mercier et Wilson, 1994) ; *Aureobasidium pullulans* (Leibeinger et al., 1997 ; Lima et al., 1997a) ; *C. sake* (Teixido et al., 1998) et des **bactéries** : *Bacillus subtilis* (Pusey et Wilson, 1984) ; *Pseudomonas cepacia* (Janisiewicz et Roitman, 1988) et *Pseudomonas syringae* (Janisiewicz et Bors, 1995).

Jusqu'à présent, au moins cinq biopesticides ont été homologués et commercialisés comme un traitement contre les maladies fongiques de post-récolte : Bio-Save® 10 LP et 11 LP (JET Harvest Solutions, USA), à base d'une souche de bactérie *Pseudomonas syringae*, pour lutter contre les pourritures de blessures des pommes et poires ; YieldPlus™ (Anchor Yeast, South Africa) à base d'une souche de levure *Cryptococcus albidus* destiné aux traitements des pommes, poires, raisins et agrumes ; BoniProtect® (Bio-Protect, Germany) à base de deux souches de levures appartenant à l'espèce *Aureobasidium pullulans* appliqué pour la protection des pommes contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* et *Monilia fructigena* ; et Candifruit™ (SIPCAM-INAGRA S.A., Spain) à base d'une souche de levure *Candida sake* utilisé pour lutter contre les principales maladies fongiques des pommes en conservation.

Dans ce contexte, l'UFR Ressources et Développement Durable de la Faculté des Sciences de Meknès, l'Institut National de la Recherche Agronomique de Meknès et l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), travaillent depuis 2003 sur la mise au point d'une stratégie de lutte biologique mettant en œuvre deux souches de levures d'*Aureobasidium pullulans* (la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5) efficaces contre les principaux parasites de blessures (*Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*) des pommes en conservation. Ces souches ont été isolées parmi la microflore épiphytique naturellement présente à la surface des pommes Golden Delicious, et présentent des taux d'antagonisme élevés (>80%) et reproductibles contre *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* (Achbani et al., 2005 ; Mounir et al., 2007 ; Bencheqroun et al., 2007).

Une étude menée par Mounir et al. (2007) a démontré que la souche Ach 1-1 produite en masse dans des fermenteurs gardait son activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea* et *P. expansum*. Une autre étude menée sur la souche Ach 1-1 a montré que le principal mécanisme d'action de cet agent antagoniste demeure la compétition pour les éléments nutritifs (Bencheqroun et al., 2007).

Cependant, l'application de nos deux souches antagonistes et leur commercialisation à grande échelle nécessitent des études préliminaires concernant (1) l'efficacité des différentes

formulation et méthodes d'application de ces deux agents antagonistes, (2) l'évolution de leur population parmi la microflore naturellement présente sur les fruits, (3) l'influence des différents facteurs environnementaux (température, humidité relative, rayonnement...) sur leur développement et leur dispersion. Ces études ne peuvent être accomplies que si l'on dispose d'un système efficace de traçage des agents de lutte biologique permettant de les identifier et de les quantifier dans l'environnement où ils ont été introduits. Outre ces aspects, le traçage constitue une exigence des procédures d'homologation et peut également avoir comme objectif fondamental d'identifier la souche d'intérêt afin de protéger son utilisation et sa commercialisation.

Les méthodes de traçage s'appuient sur les techniques biologiques conventionnelles et les techniques moléculaires. En général, les techniques de traçage sont répertoriées en trois grandes catégories : microbiologiques (classiques), directes et moléculaires. Le choix d'utilisation de l'une des ces méthodes de traçage dépend du niveau de spécificité requis. Dans le cas des agents de lutte biologique le niveau de spécificité doit être élevé permettant une discrimination précise entre des souches appartenant à la même espèce. Les méthodes de traçage microbiologiques, s'appuyant sur des critères morphologiques et l'aptitude à pousser sur un milieu de culture sélectif ou bien semi-sélectif, sont largement utilisées pour l'identification et la quantification des agents de lutte biologique. Toutefois elles sont mal adaptées pour l'identification d'une souche bien particulière. Ce manque de spécificité peut présenter un inconvénient majeur dans le cas des *A. pullulans*, du à la grande variabilité génétique de cette espèce et à son omniprésence dans la phyllosphère et la carposphère (Yurlova et al., 1995 ; Schena et al., 1999 ; Urzi et al., 1999). Au contraire l'utilisation des techniques de marquage moléculaires révélant un polymorphisme d'ADN permet de distinguer clairement entre des souches appartenant à la même espèce.

Dans le cadre global de développement d'un biopesticide efficace contre les principales pourritures des pommes en conservation, à savoir *B. cinerea* et *P. expansum*, l'objectif de notre travail consistait à développer un système de traçage mixte pour nos deux souches antagonistes (Ach 1-1 et 1113-5) permettant de les identifier spécifiquement et de suivre l'évolution de leurs populations parmi la microflore naturellement présente à la surface des fruits. La réalisation de cet objectif a été effectuée en trois étapes : (1) identification de marqueurs moléculaires spécifiques à nos deux souches étudiées par utilisation de la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ; (2) conversion de ces marqueurs RAPD en marqueurs simples et

plus stables appelés marqueurs SCAR et (3) développement d'un milieu de culture semi-sélectif permettant une quantification aisée de nos deux souches antagonistes parmi la microflore épiphytique naturelle des pommes.

Après réalisation de ces trois étapes, notre système de traçage mixte a été mis en pratique afin d'évaluer la capacité d'adaptation et de survie de nos deux souches antagonistes après leur application sur pommes et conservation en chambre froide. Ce système de traçage des agents de lutte biologique, appliqués en post-récolté, basé sur l'utilisation de marqueurs moléculaires SCAR et un milieu de culture semi-sélectif a ainsi été appliqué pour la première fois au Maroc.

Notre mémoire de thèse s'articulera autour de 4 chapitres principaux. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique qui met le point sur l'importance de la pomiculture ainsi que les pertes occasionnées par les pourritures de post-récolte, les moyens de lutte et plus particulièrement la lutte biologique, les différentes étapes nécessaires pour le développement d'une stratégie de biocontrôle des maladies de post-récolte, les différentes méthodes de traçage des microorganismes (techniques d'identification et de quantification), ainsi que leurs avantages et inconvénients, et enfin il justifi le choix de l'approche méthodologique adoptée dans le cadre de ce travail. Le second chapitre est consacré à la description du matériel et des méthodes adoptées pour la réalisation de notre étude. Les résultats obtenus sont présentés puis discutés en détaille dans le troisième et le quatrième chapitre respectivement. Enfin, une dernière partie est consacrée aux principales conclusions dégagées de ce travail et les perspectives à développer dans le futur.

Chapitre I :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

*« Le progrès de la connaissance se résume peut-être
en une meilleure compréhension de notre ignorance ».*
[Robert Mossé]

1. LA POMICULTURE

1.1. Importance économique

Au Maroc, le secteur des fruits joue un rôle économique et sociale indéniable, il occupe une superficie de 460 000 hectares de plantations fruitières (non compris l'olivier). La production annuelle globale est de l'ordre de 3 millions de tonnes de fruits (MADRPM, 2007). Ce secteur se caractérise par la diversité des espèces qu'on peut, toutefois, regrouper en plusieurs sous secteurs, plus ou moins homogènes, dont les principaux sont les suivants : les agrumes, les rosacées fruitières, la vigne, le palmier dattier, le bananier et le figuier.

Les rosacées fruitières constituent un des piliers de ce secteur et occupent une place importante dans la production des fruits. Au titre de la campagne 2006-2007, la production des rosacées fruitières a atteint 786 900 tonnes, contre 811 500 tonnes en 2005-2006, soit une baisse de 3 %. Cette quantité est composée de 506 000 tonnes de fruits de rosacées à pépins (64,3 %), et 280 900 tonnes de rosacées à noyau (36,7 %) (MADRPM, 2007).

Les pommes occupent la première place parmi les rosacées à pépins, avec 427 000 tonnes (84,4 %), suivies des poires avec 44 000 tonnes (8,7 %) et des coings avec 35 000 tonnes (7 %) (Figure 1) (MADRPM, 2007). Les plantations de pommiers se placent au 2^{ème} rang des rosacées après l'amandier. Elles couvrent une superficie d'environ 27 000 ha, dont 48 % de cette superficie exploitée, soit environ 12 978 ha, se situent dans la région de Meknès-Tafilalet (Tableau 1). Cette région est donc considérée comme le premier producteur de pommes au Maroc, elle compte de nombreux pommiers dans les zones de moyenne et de haute altitude du moyen Atlas. Le matériel végétal en culture est constitué exclusivement de variétés étrangères : Golden Delicious, Royal Gala, Starkimson, Starking Delicious, Red Delicious, Dorsett Golden, Anna, Ein Shiemer, et autres. Le nombre de variétés est en perpétuelle évolution, quoique la pomme la plus répandue demeure la Golden Delicious.

Sur le continent Africain, le Maroc contribue à raison de 30% de la production des pommes, ce qui le place en seconde position après l'Afrique du Sud. Au niveau mondial, le Maroc est considéré comme le 26^{ème} producteur de ce fruit, alors que la chine demeure comme premier

producteur mondial des pommes, avec une production annuelle d'environ 25 millions de tonnes (FAO, 2007).

La production de pommes se caractérise en général par sa nature périssable, dont le degré reste toutefois variable d'une variété à l'autre et sa conservation nécessite une infrastructure d'entreposage frigorifique suffisante et appropriée, de préférence au niveau des zones de production, en vue d'assurer une meilleure régulation de l'offre par rapport à la demande.

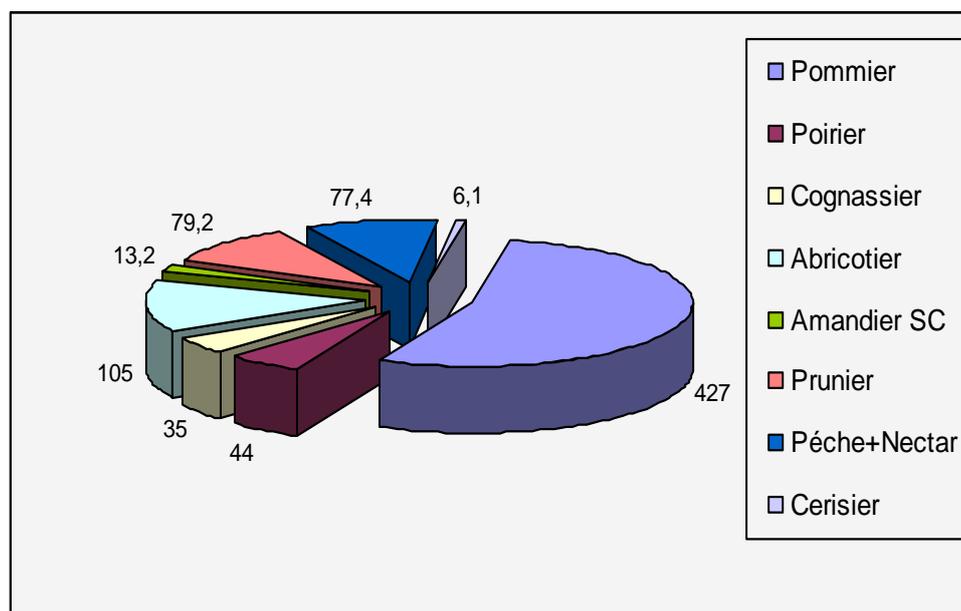


Figure 1 : Production en milliers de tonnes des rosacées fruitières au Maroc (MADRPM, 2007).

SC : Sans croûte

Tableau 1 : Superficie et production des pommes dans la région de Meknès-Tafilalet.

Région	Superficie (ha)	Production (qt)	Rendement (qt/ha)
Meknès	267	7 743	29,0
El Hajeb	1 836	367 800	200,3
Ifrane	2 200	238 800	108,5
Khénifra	7 280	1 320 000	181,3
Errachidia	1 395	153 450	110,0
Total	12 978	2 087 793	125,8

Référence : Annuaire statistique régional de Meknès-Tafilalet - 2008.

1.2. Les maladies fongiques des pommes en conservation

Les maladies de conservation des fruits à pépins occasionnent encore des pertes importantes qui peuvent atteindre 25% des fruits (Pusey et Wilson, 1984) et ce malgré les moyens de stockage modernes de ceux-ci. Cette proportion peut augmenter jusqu'à 50% dans les pays en voie de développement (Eckert et Ogawa, 1985 ; Janisiewicz et Korsten, 2002). Ces pertes sont plus élevées, en terme économique, que celles observées au champ, du fait que les coûts de récolte, de transport et de stockage s'additionnent au coût global de la production. Les pertes de post-récolte sont dues dans la majorité des cas à des pathogènes d'origine fongique, près de 90 espèces ont été identifiées comme agents de pourritures des pommes en conservation (Jones et Aldwinckle, 1991).

En se basant sur leur mode d'infection les champignons responsables des pourritures de fruits en post-récolte peuvent être classés en deux grandes catégories : les parasites de blessures et les parasites latents.

1.2.1. Les parasites de blessures

Les parasites de blessures pénètrent dans les fruits via des blessures et dont les symptômes apparaissent immédiatement après l'infection. Les blessures permettant l'infection de fruits peuvent être occasionnées par des conditions climatiques défavorables (grêle, vent violent avant la récolte) ou bien par des lésions ou coups réalisés sur fruits pendant la cueillette, le transport et le triage.

Les parasites de blessures peuvent également se propager par simple contact entre fruits sains et contaminés et multiplier par 15 à 20 le nombre de fruits initialement infectés (Jijakli, 2000). Dans ce groupe, deux espèces de champignons ont été souvent mentionnées pour être à l'origine de pertes économiquement importantes sur pommes en conservation. Il s'agit de *Botrytis cinerea* Pers. (pourriture grise) et *Penicillium expansum* Link. (pourriture bleue) (Bondoux, 1992).

1.2.2. Les parasites latents

Les parasites latents pénètrent par les voies d'entrée naturelles (lenticelles, œil, pédoncule) et leurs symptômes n'apparaissent qu'après une période de latence plus ou moins longue. Les principales espèces appartenant à cette catégorie de parasites sont les pourritures lenticellaires : *Cryptosporiopsis malicortisis*, *Gloeosporium album* et *Gloeosporium perennans*. La pénétration de ces champignons dans le fruit à travers les lenticelles se produit dans le verger. Le développement ultérieur des symptômes (pourriture des fruits) se produit lors de la phase de conservation, et ce après une période de latence pouvant atteindre quelque mois selon l'espèce fongique et les conditions de conservation.

1.3. Moyens de lutte contre les maladies de post-récolte

Afin de prévoir et limiter le développement des pourritures des fruits en conservation, il est recommandé de combiner les mesures préventives des traitements avant et/ou après récolte avec des conditions de conservation adéquates (Creemers, 1998).

1.3.1. Mesures préventives

Des mesures préventives visant à contrôler les maladies de conservation des fruits doivent être menées sur deux fronts : au verger et dans les stations de conservation.

1.3.1.1. Au verger

Il est primordial d'éviter les blessures des fruits, non seulement à la récolte, mais aussi lors des manipulations, du transport et du tri. Également des bonnes pratiques dans le verger, comme l'enlèvement des fruits infectés et des débris organiques permettent de réduire au maximum les sources de contamination. Les fruits destinés à la conservation doivent être cueillis à leur stade optimal de maturité, avant l'augmentation de la respiration, et refroidis rapidement après la cueillette. Les cueillettes hors des dates optimales entraînent des variations dans les possibilités de conservation et peuvent modifier la sensibilité à certaine maladie de conservation (Bondoux, 1992). En d'autre terme, la résistance interne des fruits aux pourritures fongiques diminue avec la maturité (Creemers, 1998).

1.3.1.2. Au niveau des stations de conservation

La vitesse de croissance des champignons pathogènes de post-récolte est considérablement influencée par l'atmosphère du frigo. En général, une basse température ralentit la croissance des champignons. La température critique pour le développement varie en fonction de l'espèce, mais pour les principaux champignons (*P. expansum* et *B. cinerea*), la croissance est encore observée à 0°C. De ce fait, l'élimination des différentes sources de contamination (caisses, eau, fruits pourris...) par la désinfection et le traitement des palox, des palettes et des caisses à l'entrée du frigo sont indispensables (Creemers, 1998).

1.3.2. La lutte chimique

Le contrôle des maladies parasitaires de conservation repose encore principalement sur des traitements par des fongicides chimiques qui sont appliqués en pré-récolte durant les semaines précédant la cueillette, et en post-récolte immédiatement après la cueillette. Cette lutte chimique est globalement satisfaisante en terme d'efficacité et du coût des produits utilisés. Bien que la plupart des traitements sont réalisés en pré-récolte, ils se révèlent souvent peu efficaces pour la protection des fruits pendant des durées de conservations longues (Jijakli, 1996).

Les fongicides les plus utilisés pour lutter contre les maladies fongiques des pommes en post-récolte appartiennent à la famille des Benzimidazoles. Ainsi un traitement à base de Thiabendazole (TBZ) reste très efficace dans le contrôle de la pourriture grise (Xiao, 2005). Par contre le TBZ est devenu faiblement efficace dans le contrôle de la pourriture bleue à cause de l'apparition de souches de *P. expansum* ayant développées une résistance vis-à-vis de TBZ (Sholberg et al., 2005).

Actuellement l'application des fongicides sur des produits agricoles devient de plus en plus limitée à cause de l'augmentation des exigences des consommateurs pour des produits plus respectueux de la santé humaine et de l'environnement. Cependant, au niveau européen, l'utilisation de plusieurs matières actives agréées a été progressivement interdite ou soumise à des conditions d'utilisation plus restrictives. Ainsi, la Vinchlozoline ne peut plus être utilisée sur pommier et poirier que pendant la période de floraison pour combattre la pourriture de la mouche (*B. cinerea*). Le Captane est interdit en Allemagne en Hollande et en Belgique pour des problèmes d'éco-toxicologie. Dans d'autres pays européens, la période entre la dernière

application de cette matière active et la récolte a été allongée. Dans un avenir proche, certains produits efficaces appartenant à la famille des Benzimidazoles ne seront plus autorisés. De plus, l'emploi de cette lutte chimique a entraîné l'apparition de souches résistantes à certaines matières actives agréées, ou même à des familles de fongicides. Cette résistance a été signalée chez *Penicillium* spp. et *Botrytis* spp. (Spotts et Cervantes, 1986; Holmes et Eckert, 1999). Une étude menée par Maouni et al. en 2002, a montré qu'*Alternaria alternata* et *P. expansum*, les deux espèces les plus redoutables sur poires en conservation au Maroc, présentaient une résistance vis-à-vis de trois fongicides appartenant à la famille des Benzimidazole : le Bénomyl, le Méthylthiophanate et le Thiabendazole.

Tous ces problèmes ont suscités chez les chercheurs et les arboriculteurs un intérêt croissant pour la recherche de méthodes de lutte alternatives contre les agents de pourriture des fruits en conservation. Cet intérêt se manifeste par l'utilisation des techniques de lutte biologique seules ou dans le cadre d'une stratégie de lutte intégrée qui sont plus respectueux pour l'environnement et la santé du consommateur.

1.3.3. La lutte biologique

La lutte biologique vise à contrôler les agents pathogènes au moyen d'agents antagonistes (champignons, bactéries, virus) ou des produits de leur métabolisme. Cette méthode de biocontrôle considérée comme une alternative à la lutte chimique, est perçue comme une approche plus soucieuse de l'environnement, de la santé du consommateur et répond plus adéquatement aux aspirations de développement durable de l'agriculture. Cependant, par rapport au nombre de molécules de synthèse homologuées de par le monde, le nombre d'agents de lutte biologique actuellement homologués pour le contrôle des maladies fongiques de post-récolte reste insignifiant.

La lutte biologique seule pour la protection des plantes contre les maladies fongiques s'est avérée le plus souvent moins satisfaisante que la lutte chimique (Cooley et al., 1996). Parmi les raisons de ces échecs, nous pouvons évoquer (1) l'inadéquation et/ou les variations des conditions environnementales limitant l'efficacité des agents de lutte biologique, (2) la difficulté de maintenir l'efficacité de l'antagoniste pendant une période suffisamment longue, (3) le manque de compétitivité économique des agents de biocontrôle par rapport aux produits chimiques existants.

A l'opposé, la conservation des fruits constitue un domaine où les limites de la lutte biologique peuvent être plus facilement surmontées, car contrairement à une application au champ, les sites d'application des biopesticides sont limités aux fruits et ceux-ci présentent une haute valeur ajoutée qui permet de supporter les coûts parfois élevés d'un traitement biologique (Fokkema, 1991). De plus, les paramètres environnementaux des chambres de stockage sont bien définis et stables au cours du temps. Les travaux concernant la lutte biologique, par utilisation de microorganismes antagonistes, contre les maladies parasitaires des fruits en conservation sont nombreux et ont fait l'objet de nombreuses publications (Wilson et Wisniewski, 1994 ; Janisiewicz et Korsten, 2002 ; Droby et al., 2009 ; Jijakli, 2010 ; Spadaro et Gullino, 2010).

Parmi ces agents antagonistes capables de contrôler les pourritures des fruits, les levures antagonistes constituent la flore épiphytique dominante, en terme de nombre d'espèces isolées à la surface des fruits non blessés en conservation (Janisiewicz, 1996). Quelques exemples de microorganismes utilisés comme agents de biocontrôle des maladies de conservation des fruits sont illustrés dans le tableau (2).

Actuellement, au moins cinq antagonistes microbiens sont commercialement disponibles comme un traitement de post-récolte pour pommes et poires: Bio-Save[®] 10LP et 11LP à base d'une souche de bactérie *Pseudomonas syringae* (JET Harvest Solutions, USA), Yield Plus[™] à base d'une souche de levure *Cryptococcus albidus* (Anchor Yeast, Afrique du Sud), BoniProtect[®] à base de deux souches de levures appartenant à l'espèce *Aureobasidium pullulans* (Bio-Protect, Germany) et Candifruit[™] à base d'une souche de levure *Candida sake* (SIPCAM-INAGRA S.A., Spain).

Tableau 2 : Exemples d'antagonistes microbiens des maladies de conservation des fruits.

Culture	Pathogène	Antagoniste	Référence
Pommes	<i>B. cinerea</i> et <i>P. expansum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Janisiewicz (1988) et Errampalli et al. (2006)
		<i>Acremonium Brevet</i>	Janisiewicz (1988)
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz et Roitman (1988)
		<i>Pichia guilliermondii</i>	Wilson et Wisniewski (1989)
		<i>Candida oleophila</i> , <i>Pichia anomala</i>	Jijakil et al. (1993)
		<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Bryk et al. (1999)
		<i>Cryptococcus albidus</i>	Fan et Tian (2001) et Zhou et al. (2001)
Pommes	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i> et <i>Rhizopus nigrican</i>	<i>Rhodoturula glutinis</i> , <i>Cryptococcus Laurantii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	Lima et al. (2003)
		<i>Candida sake</i>	Viñas et al., (1998) et Morales et al., (2008)
		<i>Pantoea agglomerans</i>	Nunes et al. (2002)
		<i>Candida saitoana</i>	El-Ghaouth et al. (2003)
		<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	Spadaro et al. (2008) et Saravanakumar et al. (2008)
Raisins	<i>B. cinerea</i> , <i>Aspergillus niger</i> et <i>R. stolonifer</i>	<i>Candida guilliermondii</i> , <i>Acremonium cephalosporium</i>	Zahavi et al. (2000)
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	Schena et al. (1999)
Bananés	<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Coste et subasinghe (1998)
		<i>Candida oleophila</i> strain O	Bastiaanse et al. (2010)
Fraises	<i>B. cinerea</i>	<i>Candida fructus</i> , <i>Candida glabrata</i> et <i>C. oleophila</i>	EL-Neshawy et Shetaia (2003)
		<i>Rhodoturula glutinis</i>	Zhang et al. (2007)
		<i>Rhizopus</i> sp.	Lima et al. (1997a)
Nectarines et Pêches	<i>Monilinia fructicola</i> <i>P. expansum</i> et <i>B. cinerea</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida oleophila</i>	
		<i>Pseudomondia corrugata</i>	Smilanick et al. (1993)
Agrumes	<i>P. digitatum</i> et <i>P. italicum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	Karabulut et Baykal (2003)
		<i>Pichia guilliermondii</i> (<i>Debaryomyces hansenii</i>)	Mehrotra et al. (1998)
		<i>Bacillus subtilis</i>	Fan et al. (2000)
Agrumes	<i>P. digitatum</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	Teixidó et al. (2001) et Cañamás et al. (2008)

2. ÉTAPES DU DEVELOPPEMENT D'UN BIOPESTICIDE

La mise au point d'une stratégie de lutte biologique, opérationnelle et efficace, contre les maladies fongiques de fruits en conservation, nécessite la réalisation de nombreuses étapes, dont chacune d'elles étant essentielle et complémentaire des autres.

2.1. Isolement et sélection des antagonistes

La meilleure période d'isolement des antagonistes potentiels dépend souvent du pathogène à combattre. Dans le cas des maladies fongiques de post-récolte, l'isolement est fait à la surface des fruits, immédiatement après la récolte ou pendant la conservation. Cette période est souvent considérée comme la plus adéquate pour l'isolement des agents de biocontrôle potentiels dans le cas des pommes en conservation (Aloi et *al.*, 1991). Néanmoins, aucune relation entre le niveau d'efficacité des souches antagonistes et leurs origines n'a été trouvée. En effet, des antagonistes efficaces sur pommes contre *B. cinerea* ont été isolés du sol, des feuilles de pommes, ou encore de fruits ou feuilles d'autres plantes (Janisiewicz, 1988 ; Wilson et Wisniewski, 1989). De plus Lima et *al.* (1999) ont montré que l'activité antagonistique d'*Aureobasidium pullulans* souche LS-30 et *Cryptococcus laurenti* LS-28, isolées à partir de pommes, contre *B. cinerea* était la même sur cinq fruits différents : pommes, pêches, fraises, kiwis, et raisins.

Après cette étape d'isolement des microorganismes, l'évaluation de leurs propriétés antagonistes vis-à-vis du pathogène constitue la seconde étape de la sélection d'un agent de lutte biologique. Cette sélection peut alors se faire aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, bien que les propriétés antagonistes d'un microorganisme s'exprimant *in vitro* ne sont pas forcément reproductibles *in vivo*. La meilleure approche pour évaluer l'activité protectrice des microorganismes antagonistes reste celle *in vivo* puisqu'elle tient compte de la réalité et des interactions de l'agent de biocontrôle avec le milieu naturel.

Dans le cas idéal, les agents de lutte biologique sélectionnés doivent, satisfaire les critères suivants (Wilson et Wisniewski, 1994) :

- une stabilité génétique,
- une efficacité à faible concentration,
- une faible exigence nutritionnelle,
- une capacité de survie et d'adaptation aux différentes conditions environnementales,
- une efficacité sur un grand nombre de pathogènes et d'hôtes,
- une préparation facile et efficace de l'inoculum (produit formulé),
- une absence de production de métabolites secondaires toxiques,
- une résistance aux pesticides,
- une compatibilité avec d'autres traitements,
- une non pathogénicité pour la plante hôte et pour l'Homme.

Tous ces critères conditionnent la réussite des phases ultérieures du développement d'un biopesticide.

2.2. Production en masse et formulation

La commercialisation et l'application à grande échelle des agents de biocontrôle requièrent d'affiner les techniques de production en masse, de séchage et de formulation de ces microorganismes. Ces techniques doivent aboutir à un produit économiquement rentable, à la standardisation des conditions de culture assurant la production d'une biomasse élevée et de qualité, et enfin une durée de vie du produit suffisamment longue permettant une application aisée par l'arboriculteur.

La production en masse (industrielle) des microorganismes est essentiellement réalisée dans des fermenteurs, dans lesquels les différents éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes sont (1) uniquement amenés en début de la culture (technique dite **batch**), (2) ou bien progressivement apportés en cours de culture (technique du **fed-batch**), (3) voir de façon continue (culture continue de type **chémostat** ou **turbidostat**).

Mounir et *al.* (2007) ont pu optimiser la production en masse d'*Aureobasidium pullulans* souche Ach 1-1 par utilisation de la technique fed-batch avec un pH contrôlé à 5. Après 48 heures de culture en fermenteur, la biomasse produite était de 106 g/L.

Afin de répondre aux exigences de stockage et de conservation d'un pesticide microbien, les techniques de séchages fondées sur la déshydratation sont les meilleures d'un point de vue pratique, car ils permettent d'optimiser les conditions de stockage, de transport, de distribution et de formulation du microorganisme. La lyophilisation est la méthode qui convient le mieux au maintien de la viabilité des microorganismes, mais son coût reste très élevé. Au niveau industriel, et dans l'objectif d'obtenir un produit bon marché, la méthode préférée est le séchage sur lit fluidisé (Montesinos, 2003).

La formulation intervient pour une grande part dans la stabilité du biopesticide lors du stockage (temps de demi-vie) et dans sa capacité de pousser et de survivre après application. Elle peut aussi jouer un rôle important dans l'augmentation de l'expression des potentialités de protection de l'agent de lutte biologique. Certains adjuvants spécifiques (substances nutritives, agents protecteurs des rayons UV et des stress osmotiques) peuvent être additionnés pour accroître la survie et l'efficacité des microorganismes antagonistes dans un environnement qui n'est pas toujours adéquat. Torres et *al.* (2003) ont montré l'efficacité du lactose et du tréhalose comme agents protecteurs permettant de maintenir une viabilité supérieure à 70% à 4°C pour une formulation liquide de cellules de *Candida sake*. Un autre exemple est celui de l'utilisation d'un milieu protecteur contenant du chlorure de calcium, le 2-désoxy-D-glucose et le Nu-Film-P (NFP) permettant l'augmentation et la stabilisation de la protection apporté par *Pichia anomala* souche K et *Candida oleophila* souche O vis-à-vis de *B. cinerea* et *P. expansum* sur pommes (Jijakli et *al.*, 1999). La combinaison de deux souches antagonistes *Metschnikowia pulcherrima* et *Cryptococcus laurentii* avec le bicarbonate de sodium a permis une protection totale des pommes stockées dans des conditions d'atmosphère contrôlée contre *P. expansum* (William et *al.*, 2007). Par ailleurs, des études ont montré que l'activité antagoniste de *C. laurentii* vis-à-vis de *P. expansum* sur poires a été significativement améliorée avec l'amendement du milieu avec la chitine ou l'acide salicylique (Yu et *al.*, 2007 et 2008). A noter aussi que des additifs alimentaires ont également contribué à une amélioration significativement de l'activité protectrice de trois espèces fongiques *C. laurentii*, *R. glutinis* et *A. pullulans* vis-à-vis de *P. expansum* sur pommes (Lima et *al.*, 2005).

2.3. Modes d'action

L'étude des mécanismes d'actions des agents de biocontrôle constitue une étape importante dans le développement d'une stratégie de lutte biologique. Cette importance se manifeste à plusieurs niveaux : (1) l'affinement et la rationalisation des protocoles de sélection des souches plus efficaces, (2) la proposition d'une formulation spécifique renforçant ces mécanismes, (3) l'apport d'éléments importants pour la constitution du dossier d'homologation de l'agent antagoniste (Jijakli et al., 1998).

Divers mécanismes d'action ont été décrits dans la littérature pour jouer un rôle important dans l'activité antagoniste des agents de biocontrôle. Il s'agit principalement de la compétition pour l'espace et les éléments nutritifs, le parasitisme (avec entre autre la production d'enzyme lytique), l'antibiose, ou encore l'activation des réactions de défense chez l'organisme hôte (Droby et Chalutz, 1994 ; Wilson et al., 1994 ; Castoria et al., 1997 et 2001). Ces mécanismes d'action peuvent contribuer simultanément ou séquentiellement au biocontrôle de l'agent phytopathogène (Janisiewicz et Korsten, 2002)

Le mode d'action principal des agents de lutte biologique, et plus particulièrement celui des levures antagonistes, reste la compétition pour les éléments nutritifs et l'espace. Dans la littérature on trouve de nombreuses études démontrant le rôle joué par ce mécanisme de compétition dans l'inhibition de croissance des agents phytopathogènes de post-récolte (Droby et Chalutz, 1994 ; Wilson et Wisniewski, 1994 ; Janisiewicz et al., 2000 ; Castoria et al., 2001 ; Spadaro et al., 2002 ; Zhao et al., 2008). Ainsi, à titre d'exemple, deux levures *Sporobolomyces roseus* et *Cryptococcus laurentii* antagonistes vis-à-vis de *B. cinerea*, colonisent plus rapidement des blessures de pommes qu'une souche non antagoniste appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Ces levures absorbent plus rapidement les sucres marqués au carbone 14 (glucose, fructose et saccharose) que les conidies de *B. cinerea* (Filonow, 1998). Jijakli et al. (1995) ont pu montrer que l'effet de protection dû a deux levures antagonistes *P. anomala* souche K et *C. oleophila* souche O vis-à-vis de *B. cinerea* sur pommes est étroitement lié à la colonisation rapide des sites de blessures, ce qui suggère que la compétition pour les éléments nutritifs pourrait être l'un des mécanismes impliqués dans la protection des pommes.

Outre la compétition pour les éléments nutritifs et l'espace, l'implication des enzymes hydrolytiques, telles que les chitinases et les glucanases, responsable de la dégradation des parois

cellulaires des pathogènes fongiques, dans le biocontrôle des agents phytopathogènes a été rapportée par de nombreuses études. Ainsi, Wisniewski et al. (1991) ont montré que l'activité antagoniste d'un isolat de *Pichia guilliermondii* vis-à-vis de *B. cinerea* est due à l'augmentation de l'activité du β -1,3-glucanase produite par l'agent antagoniste. Castoria et al. (1997) ont rapporté que le niveau d'activité du β -1,3-glucanase de deux levures antagonistes différentes était plus élevé dans le filtrat de l'antagoniste le plus efficace. De même Jijakli et Lepoivre (1998) ont signalé l'augmentation de l'activité enzymatique du β -1,3-glucanase dans les blessures de pommes traitées par *Pichia anomala* souche K. Alors que, Castoria et al. (2001) ont détecté une activité chitinase dans les blessures de pommes en présence de l'agent antagoniste *Aureobasidium pullulans* LS 30.

L'implication des microorganismes antagonistes dans la stimulation des mécanismes de défense du fruit a été aussi rapportée par plusieurs auteurs. Rodov et al. (1994) ont montré que certaines levures antagonistes étaient capables d'induire l'accumulation du Scoparone (phytoalexine) dans des fruits de citron. El Ghaouth et al. (1998) ont rapporté que *Candida saitoana* stimule la formation des barrières structurales au niveau des sites de blessures des pommes. Droby et Chalutz (1994) ont montré que l'application de la souche US-7 de *Pichia guilliermondii* permet l'augmentation de la production d'éthylène chez l'hôte et provoque l'accumulation de matériaux phénoliques dans les blessures de pamplemousses, de raisins et de carottes.

Concernant, l'intervention du phénomène d'antibiose dans la protection contre les pathogènes fongiques, plusieurs auteurs ont mis en évidence la production *in vitro* d'antibiotiques par les agents de lutte biologique et ont évalué l'implication de ces substances dans les propriétés de biocontrôle de certains microorganismes (Cook et al., 1995 ; Bélanger et al., 1995). La production de ces substances antibiotiques pour le contrôle des agents phytopathogènes de post-récolte a été principalement observée chez les bactéries (Spadaro et Gullino, 2004 ; Mikani et al., 2008 ; Alvindia et Natsuaki, 2008).

2.4. Procédures d'homologation

Les procédures d'homologation visent à garantir l'efficacité d'un biopesticide pour les utilisateurs et son innocuité tant pour l'Homme que pour l'environnement.

Au Maroc, il n'existe pas de réglementation spécifique pour l'homologation des biopesticides. Toutefois, le Décret n°2-99-106 du 5 mai 1999, relatif à l'homologation des pesticides synthétiques à usage agricole, est d'application pour toute demande d'autorisation de mise en marché des biopesticides.

Le dossier technique d'homologation d'un agent de lutte biologique doit fournir les informations concernant les risques prévisibles de son utilisation, l'identité du microorganisme, ses propriétés biologiques, la description des méthodes analytiques permettant son identification, son impact toxicologique (pathogénicité, infectivité) et ses propriétés éco-toxicologiques.

En Europe, la directive 2001/36/CE, portant exclusivement sur l'homologation d'agents de lutte biologique, stipule que la caractérisation et l'identification du microorganisme constituent les informations les plus importantes et les plus utiles. Ces informations sont à la base de l'évaluation des effets du microorganisme sur la santé humaine et sur l'environnement.

Des données récentes issues d'expérimentations toxicologiques et/ou pathologiques sur des animaux de laboratoire sont normalement exigées par cette directive, sauf si le demandeur est en mesure de démontrer, sur la base des informations fournies, que l'utilisation du microorganisme, dans les conditions proposées, n'a aucun effet nocif sur la santé humaine ou animale, ni sur les eaux souterraines, et n'a aucune incidence inacceptable sur l'environnement.

2.5. Écologie et traçage des agents de lutte biologique

Les études écologiques des agents de lutte biologique ont pour objectif d'évaluer l'adaptation et le développement des microorganismes antagonistes sous l'influence de différents facteurs environnementaux, en particulier la température, l'humidité relative, les rayonnements UV, ainsi que les éléments nutritifs (sucres, acides aminés, cires, pollen, miellat du puceron,...) disponibles dans leur environnement. Ces études ont pour fin la stabilisation et/ou l'amélioration du niveau d'efficacité des agents de lutte biologique par la protection de leur population.

L'impact des facteurs environnementaux influençant l'adaptation et la survie des agents de lutte biologique ne peut être étudié que si l'on dispose d'outils de traçage (en anglais : monitoring) permettant de les identifier et les quantifier, quelque soit l'environnement (sol, phyllosphère, rhizosphère, eaux) dans lequel ils ont été introduits.

Le traçage d'un agent antagoniste permet d'évaluer (1) l'adaptation et le développement de l'antagoniste parmi la microflore naturelle, (2) l'efficacité des différentes formulations et méthodes d'application de l'antagoniste, (3) l'impact et la persistance du microorganisme dans l'environnement.

Le développement d'une méthode de traçage adaptée pour une souche antagoniste est donc primordial pour mener à bien certaines étapes telles que l'homologation, l'optimisation de la formulation et du mode d'application. Outre ces aspects, le traçage a comme objectif fondamental d'identifier la souche d'intérêt afin de protéger sa commercialisation (Jijakli, 2001). De plus, le traçage de la souche antagoniste pendant et après sa production en masse et sa formulation, constitue une condition préalable pour établir une procédure de contrôle de qualité du biofongicide (De Clercq et *al.*, 2003).

3. MÉTHODES DE TRAÇAGE DES MICROORGANISMES APPLIQUÉS EN LUTTE BIOLOGIQUE

De nombreuses méthodes de traçage ont été mises au point pour l'identification et la quantification des microorganismes dans la nature, et un grand nombre d'information est disponible sur ce sujet dans la littérature (Van Elsas et *al.*, 1998 ; Olive et Bean, 1999 ; Schena et *al.*, 2000 ; Björklöf et Jorgensen, 2001). Dans notre étude on a focalisé notre recherche bibliographique sur les méthodes de traçage principalement utilisées dans le domaine de la lutte biologique.

Les méthodes de traçage peuvent être classées en trois principaux groupes : (1) les méthodes **microbiologiques** (ou classiques), (2) les méthodes **directes** et (3) les méthodes **moléculaires**. Quelque soit la méthode de traçage utilisée, les deux étapes essentielles pour la mise au point d'une méthode de traçage sont le choix d'une technique d'**identification** précise du microorganisme antagoniste et d'une technique de **quantification** permettant d'évaluer le niveau de sa population.

Généralement, les techniques choisies pour l'identification des agents de lutte biologique, doivent présenter un pouvoir de discrimination taxonomique très élevé arrivant jusqu'au la

différenciation entre des souches apparentées, et ceci est dû au fait que les agents antagonistes seront libérés dans un environnement comportant une communauté complexe de microorganismes, ainsi que des souches appartenant à la même espèce de l'agent antagoniste.

Dans ce qui suit, on va essayer de décrire les différentes méthodes de traçage (techniques d'identification et de quantification), de présenter leurs avantages et inconvénients respectifs en les illustrant par des exemples concrets liés au domaine de la lutte biologique.

3.1. Méthodes de traçage microbiologiques

Les méthodes de traçage microbiologiques, appelées aussi méthodes de traçage classiques ou traditionnelles, sont largement utilisées pour suivre l'évolution des populations des souches utilisées en lutte biologique. Ces méthodes sont principalement basées sur la capacité des microorganismes à se multiplier et former des colonies sur un milieu de culture approprié dans lequel seule la souche cible est capable de se développer, ou bien dans lequel la souche cible est facilement distinguée des autres souches.

3.1.1. Techniques d'identification microbiologiques

L'identification des microorganismes est basée classiquement sur des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques. L'étude de ces critères de marquage classique nécessite l'isolement préalable du microorganisme sur différents milieux de cultures, suivi par des observations et des analyses microscopiques et des tests d'assimilation et/ou de fermentation. Une combinaison entre ces trois critères a permis à Grondona et *al.* (1997) de caractériser *Trichoderma harzianum*, agent de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes du sol.

Bien que ces critères soient largement utilisés en taxonomie, ils ne peuvent pas être appliqués pour l'identification d'une souche antagoniste parmi une importante microflore épiphytique naturellement présente à la surface des fruits. En effet, les techniques classiques d'identification sont soumises à des erreurs de différenciation entre des souches apparentées à la souche cible et sont souvent limitées à l'espèce. De plus les critères morphologiques et physiologiques sont instables et varient en fonction du temps d'incubation et des milieux de culture utilisés.

3.1.2. Techniques de quantification microbiologiques

Traditionnellement, la quantification des microorganismes s'effectue par comptage des unités formatrices de colonies (ufc). Après isolement des microorganismes à partir d'un environnement traité, c'est-à-dire dans lequel l'agent de lutte biologique a été introduit, une aliquote de la suspension microbienne est étalée sur un milieu de culture approprié, et la population de la souche d'intérêt est quantifiée par comptage de ses ufc.

La quantification des souches d'intérêt par comptage des ufc nécessite la mise au point de milieux de culture sélectifs ou bien semi-sélectifs présentant des propriétés antifongiques et antibactériennes. En bactériologie, il existe des milieux de culture qui permettent de sélectionner des groupes particuliers, voir des espèces, par exemple le milieu king B permet d'identifier les *Pseudomonas* productrice de sidérophores fluorescents.

A notre connaissance, il n'existe pas de conditions culturales permettant de sélectionner une souche de champignon, de bactérie ou de levure à moins qu'elle ne soit transformée avec un gène de résistance à un antibiotique ou un fongicide. Ainsi Bowen *et al.* (1996) ont transformé génétiquement une souche antagoniste de *Trichoderma harzianum* par un gène de résistance à l'Hygromycine B pour faciliter son identification et sa quantification.

D'autre part, un milieu de culture sélectif mis au point par Elad *et al.* (1981) pour faciliter l'isolement des *Trichoderma* spp, a été utilisé par Heiberg *et al.* (1996) pour quantifier la souche T3 de *Trichoderma harzianum* et G2 de *Trichoderma virens*. De Clercq *et al.* (2003) ont utilisé un milieu de culture semi-sélectif composé d'Hygromycine B de Sumico et de Thiram pour quantifier la souche k de *Pichia anomala* après application sur pommes.

La quantification des agents antagonistes par comptage des ufc reste encore largement utilisée, car elle présente un certain nombre d'avantages : (1) la simplicité de mise en œuvre, (2) elle est universellement applicable et (3) peu coûteuse. De plus cette technique offre le grand avantage de ne détecter que les cellules vivantes et aptes à se développer sur un milieu de culture approprié. Par contre le problème majeur de cette technique classique reste la reconnaissance de la souche cible qui est rarement possible sur base de critères morphologiques.

Cette limite a suscité la recherche d'autres techniques plus performantes en terme de spécificité exigée pour le développement d'une technique précise permettant d'identifier et de suivre la souche antagoniste cible dans ses sites d'action.

3.2. Méthodes de traçage directes

Méthodes de traçage directes sont basées principalement sur la détection d'un caractère phénotypique spécifique de l'agent de biocontrôle, telle que l'émission de fluorescence. Ces méthodes de traçage permettent de quantifier les microorganismes cible *in situ*.

3.2.1. Techniques d'identification directes

La détection spécifique des souches cibles se fait par insertion d'un gène marqueur. Un gène marqueur est une construction moléculaire constitué d'un promoteur pouvant fonctionner dans un système eucaryote ou procaryote, d'une séquence codante pour une protéine facilement détectable et d'une région terminatrice. Les gènes marqueurs les plus utilisés sont le gène *gus* qui code pour une β -glucoronidase visualisable par cytoenzymologie, le gène *gfp* (Green Fluorescent Protein) codant pour une protéine naturellement fluorescente, le gène *lux* (Luciférase enzyme) codant pour une luciférase détectable par bioluminescence, et le gène *lac Z* qui code pour une β -galactosidase repérable par cytoenzymologie.

Cette technique de marquage par insertion de gène a été utilisée avec succès pour l'identification et la détection des microorganismes antagonistes. L'introduction du gène *gus* dans la souche T3 de *Trichoderma harzianum*, a permis de visualiser et de suivre la colonisation des racines du concombre par cette souche (Green et Jensen, 1996). Le gène *gfp* a été utilisé pour le traçage de l'agent de biocontrôle du feu bactérien *Pseudomonas fluorescence* A506 (Tombolini et al., 1997). Bae et Knudsen (2000), ont combiné l'utilisation des deux gènes marqueurs *gus* et *gfp* pour suivre la dynamique de population du biopesticide *Trichoderma harzianum* ThzID1-M3. Cette souche antagoniste a été également transformée par un gène de résistance à l'Hygromycine B.

Ces gènes marqueur peuvent aussi être utilisés comme une cible d'amorces PCR afin de détecter de façon spécifique la souche d'intérêt. Dans ce contexte un agent de lutte biologique *Candida oleophila* souche I-128 (nom commercial : AspireTM) connu pour son activité antagoniste contre les maladies fongiques de post-récolte des fruits, a été transformé avec un gène *gus* non fonctionnel. Toutefois ce gène restait une cible spécifique pour la détection de la souche I-128 par PCR (Chand-Goyal et al., 1998).

La technique de marquage par insertion de gènes est une technique qui a été utilisée avec succès pour étudier l'écologie des microorganismes, car elle permet de les visualiser et les quantifier *in situ*. Cependant, l'utilisation de cette technique pour le marquage d'agent de biocontrôle, aboutit à l'obtention de microorganismes génétiquement modifiés (MGMs), ce qui va rendre leur commercialisation beaucoup plus délicate compte tenu de l'apparition ces dernières années d'une forte restriction au niveau politique et social vis-à-vis de l'utilisation des MGMs. De plus il est indispensable de vérifier que les souches antagonistes transformées génétiquement présentent les mêmes caractéristiques que la souche sauvage, ce qui reste difficile à démontrer.

3.2.2. Techniques de quantification directes

La quantification des microorganismes est réalisée par des méthodes de détection optiques, telles que la microscopie en fluorescence (microscopie à épifluorescence et microscopie confocale à balayage laser), la spectroscopie de fluorescence et la cytométrie en flux.

La microscopie en fluorescence est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques en biologie. Cette technique permet la quantification directe par comptage des cellules fluorescentes avec le microscope.

La spectroscopie de fluorescence, ou encore fluorométrie ou spectrofluorométrie, est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la fluorescence d'un échantillon. Elle implique l'utilisation d'un rayon de lumière (habituellement dans l'ultraviolet) qui va exciter les électrons des molécules de certains composés et les fait émettre de la lumière de plus basse énergie, typiquement de la lumière visible. Cette technique permet une quantification indirecte des cellules par estimation de la quantité de fluorescence émise.

La cytométrie en flux (CMF) est une technique permettant de faire défiler des cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population de cellules suivant plusieurs critères et même de les trier et les séparer physiquement, pour pouvoir obtenir des populations pures à partir d'un mélange.

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de particules isolées (cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle,

quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle permet d'énumérer des populations de microorganismes en fonction de leur morphologie, la taille et la gamme de longueur d'onde émise.

L'utilisation des méthodes de quantification par microscopie reste fastidieuse vu que le comptage des microorganismes étudiés se fait de façon visuelle. En revanche, la spectroscopie de fluorescence et la cytométrie en flux sont deux techniques automatisées et la taille de population des microorganismes est facilement obtenue. La cytométrie en flux a déjà été utilisée pour suivre la dynamique de population de *P. fluorescens* SWB25 doublement marqué par le gène *gfp* et le gène *lux*. (Unge et al., 1999). Lowder et al. (2000) ont utilisé à la fois la microscopie à épifluorescence, la cytométrie en flux et la spectroscopie de fluorescence pour le traçage de l'agent de biocontrôle *P. fluorescens* A506 marqué avec le gène *gfp*.

3.3. Méthodes de traçage moléculaires

Les techniques moléculaires, ciblant les séquences des acides nucléiques, offrent un large éventail d'outils permettant l'identification et la quantification de différents types de microorganismes de façon beaucoup plus précise et plus spécifique que les techniques de traçage antérieurement citées.

3.3.1. Techniques d'identification moléculaires

Les marqueurs moléculaires correspondent au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéine, et est indépendante des conditions de l'environnement. Actuellement on dispose de plusieurs techniques de marquage moléculaires permettant de marquer les microorganismes au niveau de leur ADN, mais toutes ces techniques n'ont pas le même pouvoir discriminatoire (Tableau 3) (Savelkoul et al., 1999). Les caractéristiques de chacune de ces techniques, son principe, son coût et ses domaines d'application ont été largement détaillées dans la littérature (Olive et Bean, 1999).

Tableau 3 : Niveau de discrimination taxonomique des différentes techniques de marquage moléculaires (Savelkoul et *al.*, 1999).

Famille	Genre	Espèces	Sous-espèces	souche
Séquençage de l'ADN				
Séquençage du 16S rDNA				
tRNA-PCR				
ITS-PCR				
				Insertion de gènes marqueurs
RFLP, PFGE				
AFLP				
RAPD, UP-PCR				
Rep-PCR				

Les techniques les plus utilisées pour l'identification de marqueurs d'ADN révélant un polymorphisme de séquence entre souches sont : la **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism), la **PFGE** (Pulsed Field Gel Electrophoresis), l'**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism), la **Rep-PCR** (Repetitive sequence-based PCR) et la **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA). Le choix d'utilisation de l'un de ces systèmes de marquage dépend de l'objectif fixé, ainsi que des moyens et des compétences disponibles dans un laboratoire de recherche.

3.3.1.1. Le marquage par la technique RFLP

La technique RFLP (Botstein et *al.*, 1980) est basée sur la migration électrophorétique de l'ADN après digestion par une ou plusieurs enzymes de restrictions. Ces enzymes reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent l'ADN à chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs. Les fragments de restriction seront ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide, un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Ainsi un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) est mis en évidence.

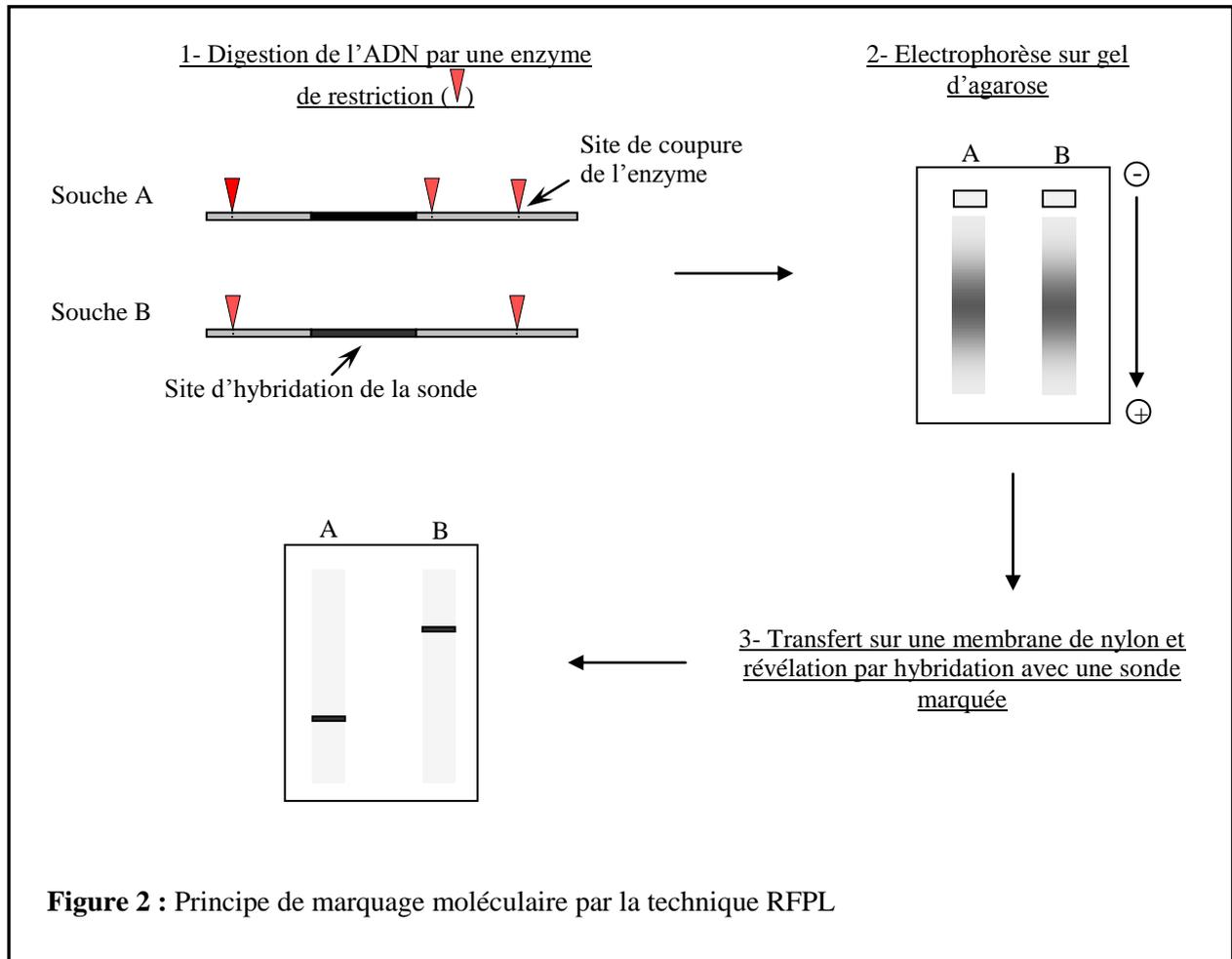
Les fragments de restriction séparés par électrophorèse sont transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose après dénaturation. Cette membrane est mise en contact avec une solution contenant un fragment d'ADN (ou sonde) qui permet de repérer, par hybridation moléculaire, des fragments d'ADN génomique qui lui sont homologues. La localisation de façon spécifique des fragments d'ADN qui sont hybridés avec la sonde pourra se faire par autoradiographie si la sonde est marquée préalablement avec du phosphore radioactif (sonde chaude) ou bien par réaction coloré si la sonde est associée à un conjugué enzymatique (sonde froide).

C'est le couple enzyme/sonde qui constitue le marqueur. La sonde révèle un locus polymorphe ou monomorphe. Le polymorphisme détecté est dû à des mutations au niveau des sites de restriction de l'enzyme (polymorphisme de site de restriction) et/ou à des délétions/insertions d'un fragment d'ADN au voisinage de la zone génomique reconnue par la sonde (Figure 2).

Initialement, la technique RFLP associée au Southern-blot était utilisée pour la détection et la localisation des gènes. Dans ce cas il fallait connaître la séquence du gène d'intérêt afin de synthétiser la sonde du Southern.

Cette technique a été adaptée pour la différenciation entre des souches appartenant à la même espèce. Cette différenciation est due au fait que les emplacements des sites de reconnaissance des enzymes de restriction à l'intérieur d'un locus particulier peuvent être polymorphes entre les souches. Ce polymorphisme est traduit au niveau du gel de migration par des bandes de tailles différentes entre des souches dissemblables.

Les étapes de digestion de transfert et de révélation par hybridation rendent cette technique lente et laborieuse dans sa mise en œuvre ce qui explique le fait que cette technique est peu utilisée.



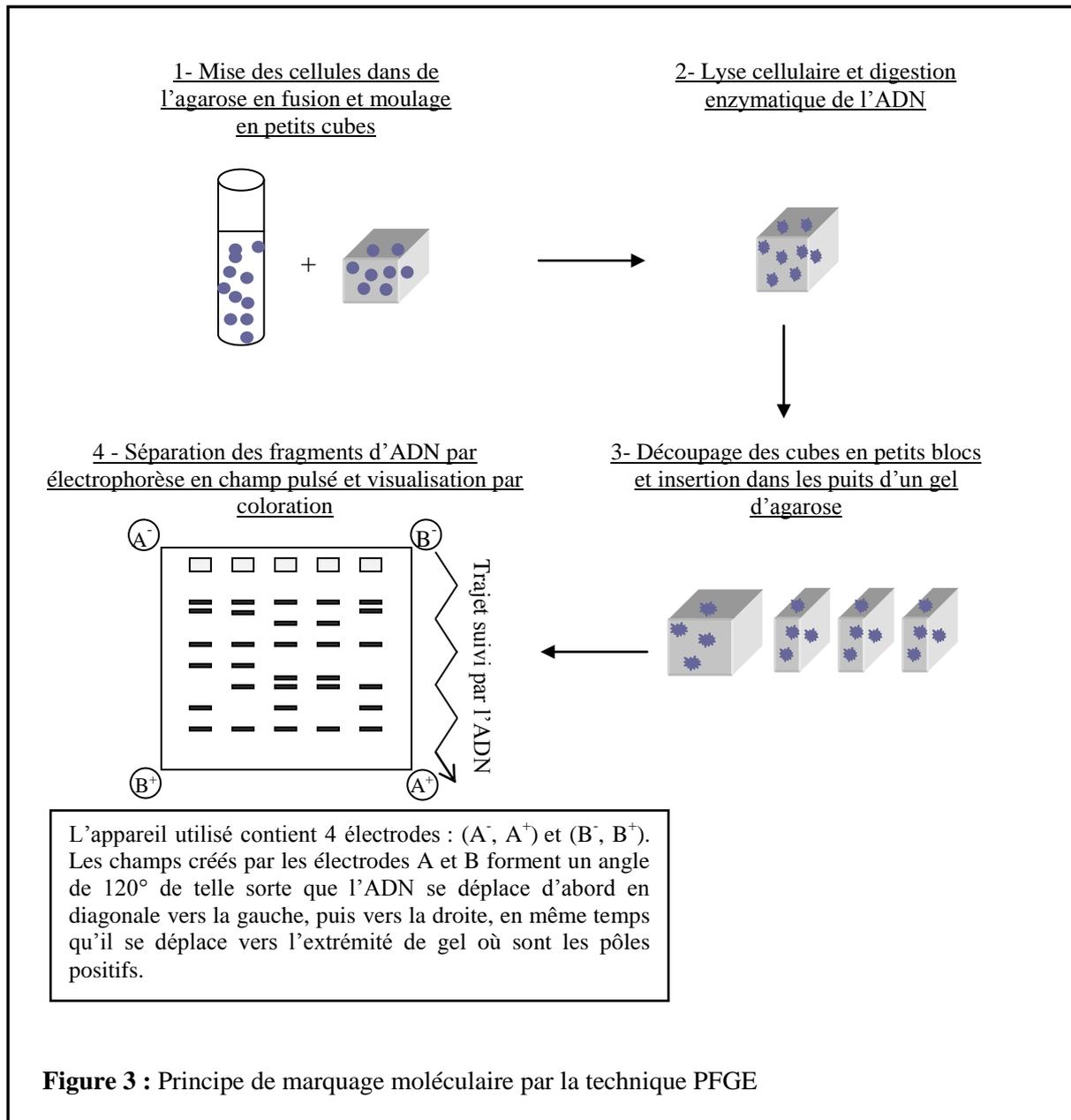
3.3.1.2. Le marquage par la technique PFGE

L'électrophorèse en champ pulsé a été développée par Carle et Olson en 1985, elle est considérée comme une variante de la RFLP. Ainsi, pour la PFGE, les isolats de microorganismes sont empaquetés dans une matrice d'agarose en fusion puis ils sont versés dans des petits moules, pour obtenir à la fin des petits blocs d'agarose contenant des microorganismes entiers. Les microorganismes emprisonnés sont soumis *in situ* à une lyse enzyme/détergent afin de dégrader la paroi cellulaire et permettre la libération de l'ADN. Ainsi libérée, l'ADN reste emprisonné dans l'agarose et est soumis à une digestion avec une enzyme de restriction à faible

fréquence de coupure. Les blocs digérés sont alors insérés dans un gel d'agarose et les fragments d'ADN emprisonnés à l'intérieur de ces blocs sont soumis à une électrophorèse avec des champs électriques alternatifs dont l'orientation relative peut varier selon les systèmes de 90 à 180°. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ. Le temps nécessaire à cette réorientation est proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter. Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration qui est proportionnel à la taille de la molécule. Le champ pulsé permet une claire séparation des fragments d'ADN de très grandes longueurs moléculaires de 10 à 800 kb (Schwartz et Cantor, 1984). Après électrophorèse ces fragments sont directement visualisés par coloration de l'ADN. Le polymorphisme obtenu est basé sur la conservation ou non de sites de restriction (Figure 3).

La PFGE est considérée comme la méthode de marquage moléculaire ayant le plus grand pouvoir de discrimination intraspécifique (Olive et Bean, 1999). Bostock et *al.* (1993), ont comparé le marquage moléculaire de 14 souches de *Candida albicans* par RAPD, RFLP et PFGE. La PFGE a fourni un profil différent pour chaque souche. Deux amorces RAPD ont été nécessaires pour différencier les 14 souches, alors que la RFLP n'a permis la distinction que de six souches.

Toutefois, le temps nécessaire pour compléter l'analyse est considéré comme le facteur qui limite l'usage de la PFGE à grande échelle. Alors que les étapes de la technique sont simples, le temps nécessaire pour avoir des résultats peut être de 2 à 3 jours. Cela peut réduire la capacité des laboratoires d'analyser un grand nombre d'échantillons. De plus la PFGE génère des fragments de très grande taille (10 à 800 kb) ce qui rend cette technique difficilement utilisable pour la sélection d'amorces PCR.



3.3.1.3. Le marquage par la technique AFLP

L'AFLP est une technique basée sur l'amplification sélective de fragments de restriction obtenus à partir de l'ADN génomique (Vos et *al.*, 1995). Après extraction, l'ADN génomique est digéré par deux enzymes de restriction, l'une avec une faible fréquence de coupure (par exemple *EcoRI*) et l'autre avec une fréquence de coupure plus importante (par exemple *Mse I*). Des adaptateurs de séquences connues et spécifiques aux sites de restriction sont fixés par l'action d'une ligase aux extrémités des fragments de restriction. Une première amplification PCR, dite

pré-sélective, est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires aux séquences des adaptateurs et des sites de restriction.

La deuxième amplification dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de un à trois nucléotides arbitraires. Ainsi, seuls les fragments possédant des sites complémentaires des bases arbitraires vont être amplifiés. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine. Les produits d'amplification sélective sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, la détection des bandes AFLP est faite soit par coloration au nitrate d'argent, soit par utilisation d'amorces marquées radioactivement (^{32}P) ou bien marquées par un chromophore fluorescent lors de l'amplification sélective. C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui constitue le marqueur AFLP (Figure 4).

Le polymorphisme AFLP peut être dû (1) à une mutation des sites de restriction, (2) à une mutation dans les séquences adjacentes aux sites de restrictions, (3) ou bien à une délétion ou insertion dans les produits d'amplifications.

De nombreuses études ont montré que le marquage des microorganismes par la techniques AFLP est reproductible et présente une très grande capacité de différencier entre des souches apparentées (Olive et Bean., 1999). De plus, cette technique ne nécessite pas une connaissance préalable des séquences génétiques du microorganisme étudié ni la construction de banques génomiques ou de cDNA. La technique AFLP a été utilisée avec succès par Lima et *al.* (2003) pour l'identification spécifique de trois agents de lutte biologique, il s'agit de *Rhodotorula glutinis* LS11, *Cryptococcus laurentii* LS28 et *Aureobasidium pullulans* LS30. De la même façon, De Curtis et *al.* (2004), par utilisation de l'AFLP, ont déterminé trois marqueurs de tailles différentes (398, 431 et 457 pd) spécifiques à la souche LS 30 d'*Aureobasidium pullulans*.

En microbiologie, l'AFLP connaît une grande utilisation en tant que technique de caractérisation moléculaire au niveau intraspécifique, car elle fournit un nombre élevé de bandes polymorphes. Toutefois, le coût élevé de la technique (elle est couverte par un brevet de la société Néerlandaise Keygene), et les difficultés de sa mise en œuvre, limitent son utilisation à grande échelle.

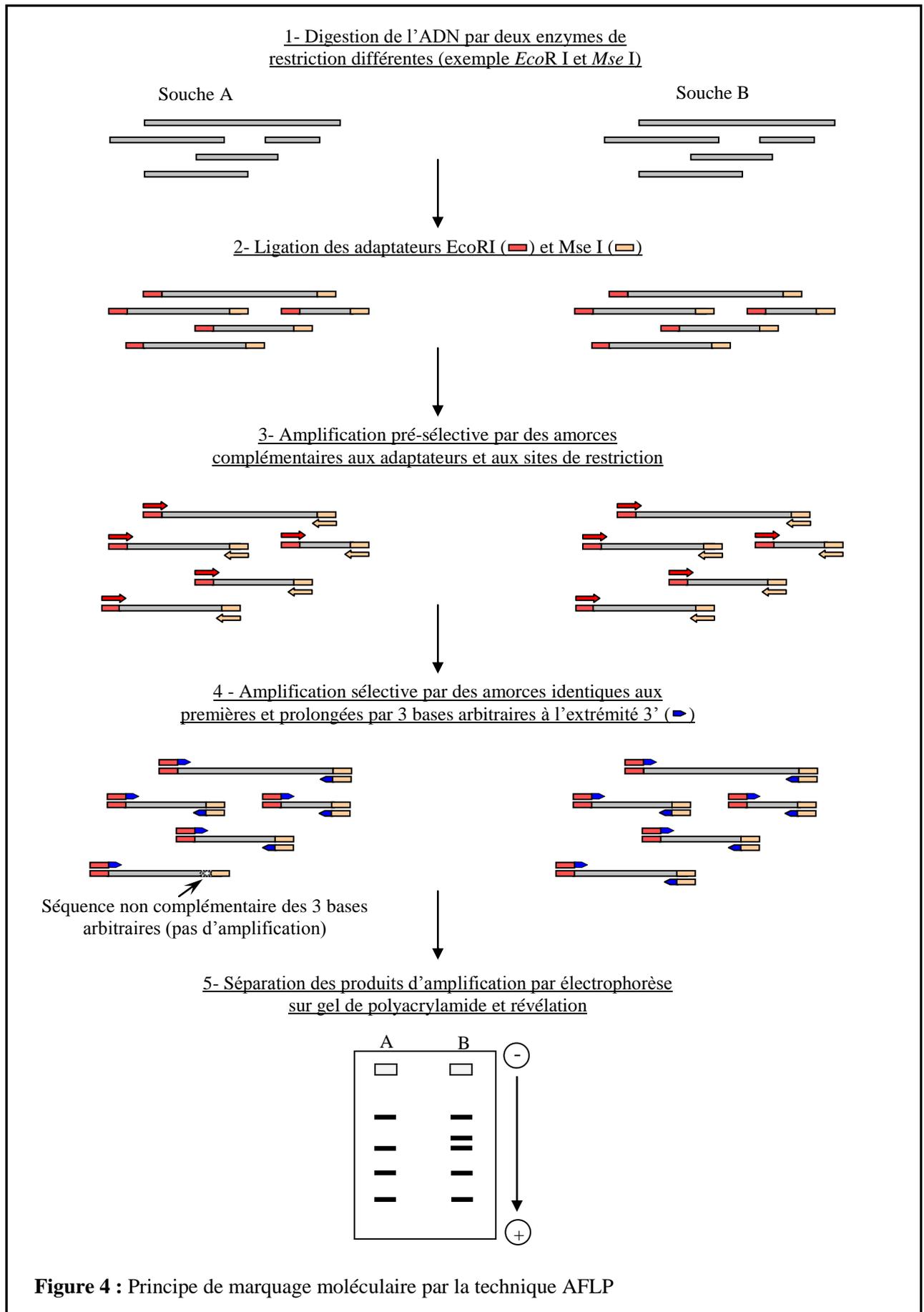


Figure 4 : Principe de marquage moléculaire par la technique AFLP

3.3.1.4. Le marquage par la technique Rep-PCR

La Rep-PCR est une technique de marquage moléculaire basée sur l'amplification de séquences d'ADN bordées par des séquences répétitives hautement conservées. Chez les eubactéries il existe trois familles de séquences répétitives, il s'agit des séquences **REP** (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence) de 35 à 40 pb (Higgins et *al.*, 1982), **ERIC** (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence) de 124 à 127 pb (Hulton et *al.*, 1991) et **BOX** (composé de 3 sous unités boxA, boxB et boxC) de 154 pb (Martin et *al.*, 1992). Les éléments répétitifs peuvent être présents sur une molécule d'ADN dans les deux orientations, et les amorces PCR ont été conçues de façon à permettre une amplification sélective de distinctes régions génomiques localisées entre les séquences REP, ERIC et BOX (Figure 5).

Les séquences des amorces consensus et les conditions d'amplification REP-PCR, ERIC-PCR et BOX-PCR sont disponibles dans la littérature (Versalovic et *al.*, 1991 et 1994 ; Jedryczka et *al.*, 1999). Après amplification PCR avec les amorces consensus, la comparaison des profils des produits d'amplification obtenus permet la discrimination entre souches appartenant à la même espèce. Le polymorphisme est dû à une différence de distance entre deux éléments répétitifs adjacents.

Initialement, la Rep-PCR par emploi de REP, ERIC et BOX était utilisée pour la différenciation de souches d'espèces procaryotes. Ainsi, la Rep-PCR a été utilisée avec succès pour la différenciation des souches de *Bacillus subtilis* (Versalovic et *al.*, 1991) et *Burkholderia cepacia* (Hamill et *al.*, 1995). Elle a été aussi utilisée pour le marquage moléculaire de certains antagonistes bactériens comme *Pseudomonas spp* (McSpadden-Gardener et *al.*, 2000), *P. fluorescens* (Landa et *al.*, 2002) et *Pseudomonas corrugata* 2140 (Choi et *al.*, 2003). De nombreuses études ont montré que les séquences REP, ERIC et BOX sont également présentes chez les champignons (Van Belkum et *al.*, 1993 ; Edel et *al.*, 1995 ; Jedryczka et *al.*, 1999 ; Arruda et *al.*, 2003).

La technique Rep-PCR présente un haut pouvoir de discrimination intra-spécifique (Olive et Bean 1999). Malgré cela, il n'a pas été possible de trouver dans la littérature un exemple de développement d'amorces PCR, spécifiques à une souche cible, au départ d'un fragment Rep-PCR.

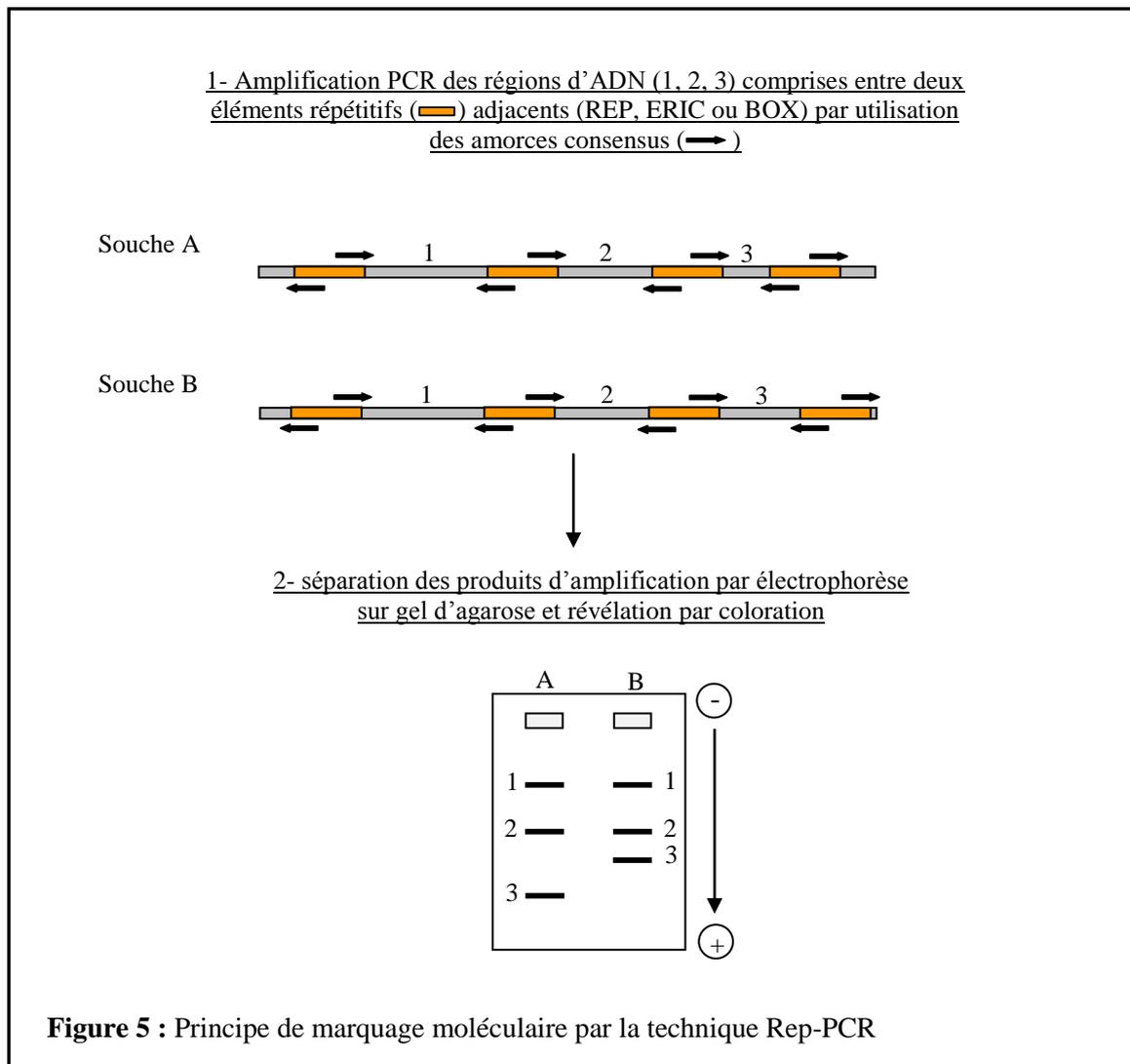
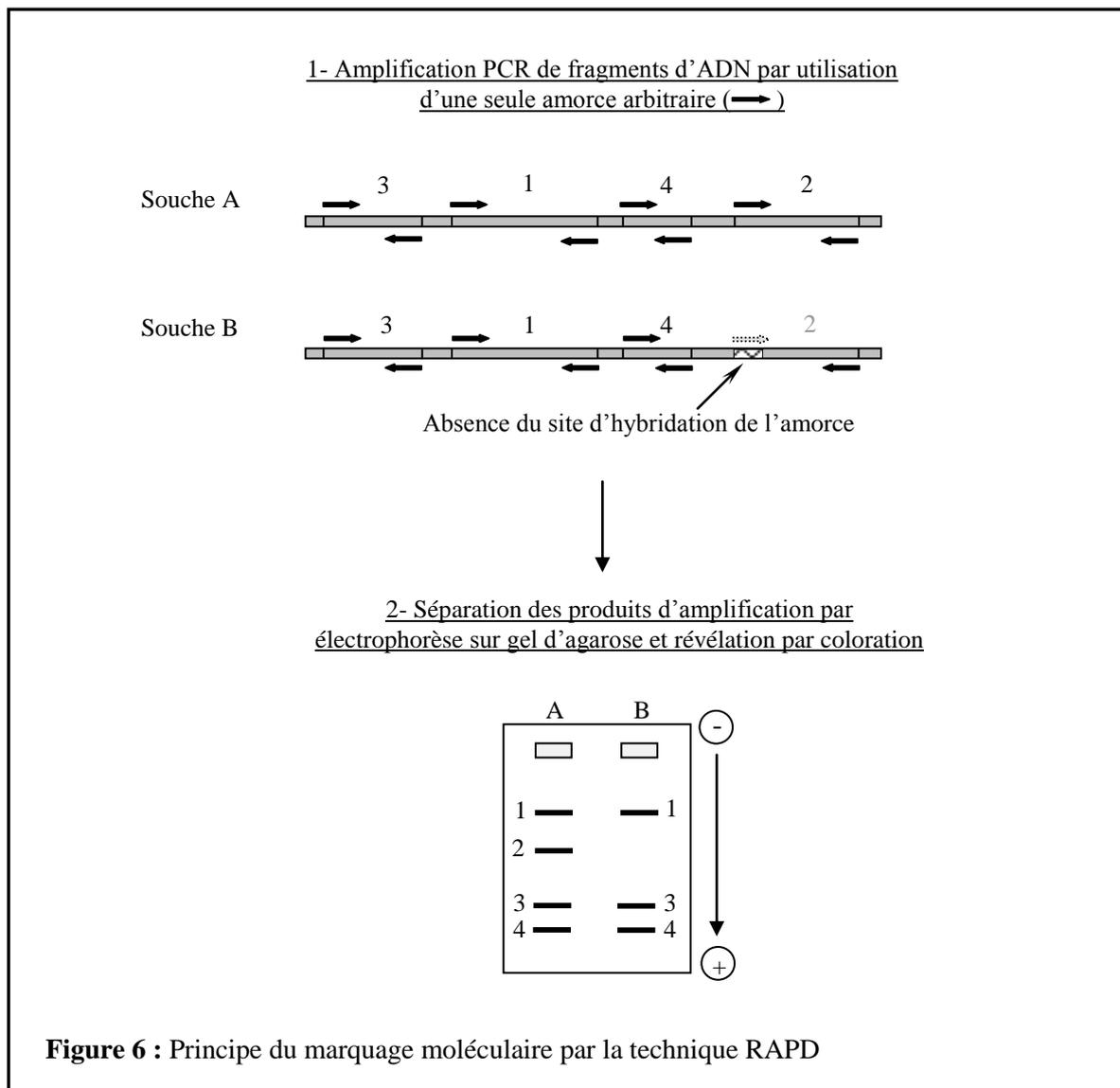


Figure 5 : Principe de marquage moléculaire par la technique Rep-PCR

3.3.1.5. Le Marquage par la technique RAPD

La technique RAPD a été développée pour la première fois par Williams et *al.* (1990). Son principe consiste en une réaction PCR faisant intervenir une seule amorce de séquence arbitraire et de taille courte (10 bases). Le fait que ces amorces sont de courte longueur, leur permet de trouver avec une probabilité importante plusieurs séquences homologues dans un génome de grande taille.

L'hybridation est faite dans des conditions peu stringentes (35 à 36°C). Ainsi l'amorce va s'hybrider chaque fois qu'elle trouve dans l'ADN de l'individu étudié une séquence qui lui est complémentaire ou bien comportant un nombre limité de mésappariements (mismatches). Si deux amorces RAPD s'apparient en opposition sur les deux brins d'ADN matrice et la distance entre les deux sites d'appariement n'est pas trop importante (inférieur à 3 kb), il y'aura amplification exponentielle d'un fragment d'ADN compris entre les deux sites d'hybridation. Lorsqu'un des deux sites est absent dans un autre individu, il n'y aura pas d'amplification PCR et un polymorphisme de présence ou absence de bandes sera observé (Figure 6). Ce polymorphisme peut être dû soit à des mutations (insertion, délétion, substitution et inversion) dans les régions amplifiées soit au niveau des sites d'hybridation des amorces.



La technique RAPD présente plusieurs avantages, c'est une technique simple, rapide, et ne nécessite pas une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Elle évite les étapes de digestion par les enzymes de restriction, de transfert sur une membrane, ainsi que la préparation et le marquage de sondes.

Néanmoins la RAPD présente un inconvénient qui est celui de la reproductibilité et du transfert entre laboratoires, car la technique est sensible à la concentration des différents constituants du mélange réactionnel et aux conditions de la réalisation de la PCR. Ces problèmes de reproductibilité peuvent être surmontés par optimisation des conditions de préparation des échantillons et du régime thermique des cycles PCR, mais surtout par la conversion des marqueurs RAPD en marqueurs SCAR (Sequence Characterised Amplified Regions) beaucoup plus stable. Le principe de la conversion consiste à séquencer un fragment RAPD amplifié de façon spécifique chez la souche cible, puis sur base de la séquence trouvée, des amorces SCAR sont définies soit à l'intérieur de cette séquence, soit par prolongement de l'amorce RAPD. Par la suite, ces amorces seront utilisées directement dans une réaction PCR, pour permettre uniquement l'amplification de la région d'ADN spécifique à la souche cible (Figure 7).

La spécificité des couples d'amorces SCAR conçus doit être vérifiée sur un grand nombre de souches appartenant à la même espèce que la souche cible ainsi que sur d'autres espèces apparentées. Le couple d'amorces SCAR simplifie l'identification de la souche étudiée parce qu'il fournit un produit d'amplification unique au lieu d'un profil d'amplification plus complexe (Paran et Michelmore, 1993). En utilisant ces amorces SCAR, il est possible de détecter la souche cible en réalisant une simple réaction PCR sur un échantillon d'ADN complexe (un mélange d'ADN de plusieurs souches), car seul le fragment SCAR spécifique à la souche cible sera amplifié. L'utilisation de conditions d'amplification de forte stringence rendent ces marqueurs SCAR beaucoup plus stables, reproductibles et très spécifiques.

De la même façon les marqueurs spécifiques d'une souche d'intérêt obtenu par RFLP, Rep-PCR ou AFLP peuvent être transformés en marqueurs SCAR. Cependant la RAPD reste la technique la plus utilisée pour le développement de marqueurs SCAR spécifiques aux agents de lutte biologique. Le tableau 4 regroupe quelques exemples dans lesquels la technique RAPD a été utilisée avec succès pour étudier le polymorphisme des agents antagonistes, et par la suite développer des amorces SCAR pour faciliter leur détection dans n'importe quel environnement.

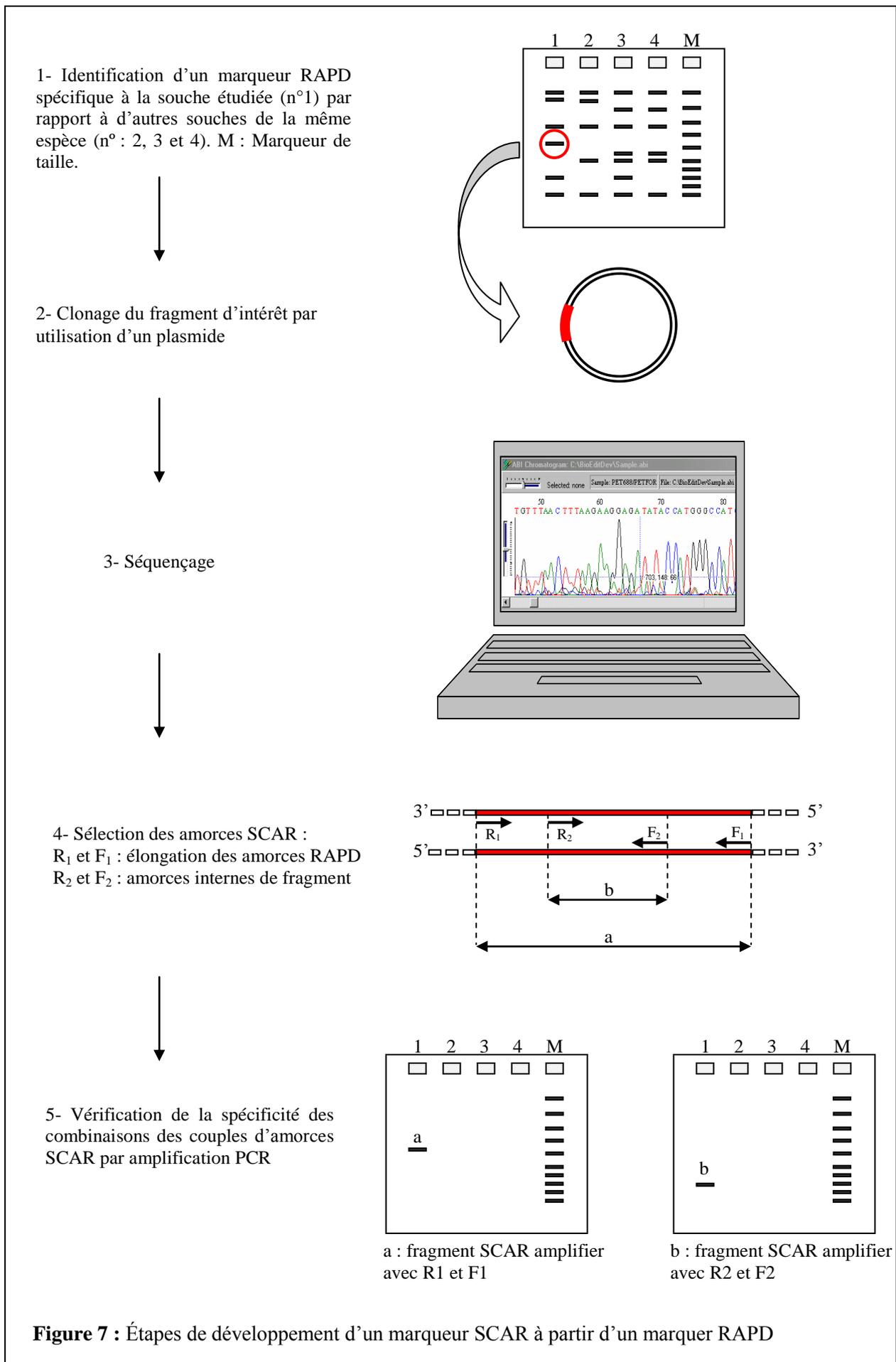


Figure 7 : Étapes de développement d'un marqueur SCAR à partir d'un marqueur RAPD

Tableau 4 : Exemples d'utilisation de la RAPD pour le développement de marqueurs SCAR spécifiques à certains agents de biocontrôle.

Espèce	souche	Référence
Bactéries		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	29A	Chapon et al., (2000)
<i>Pantoea agglomerans</i>	CPA-2	Nunes et al., (2008)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	EPS62e	Pujol et al., (2005)
Levures		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	L47	Schena et al., (2002)
<i>Pichia anomala</i>	k	De Clercq et al., (2003)
Champignons		
<i>Gliocladium catenulatum</i>	J1446	Paavanen-Huhtala et al., (2000)
<i>Trichoderma virens</i>	GV4	Dodd et al., (2004)
<i>Colletotrichum coccodes</i>	183088	Dauch et al., (2003)
<i>Trichoderma atroviride</i>	11	Hermosa et al., (2001)
<i>Trichoderma hamatum</i>	382	Abbasi et al., (1999)

3.3.2. Techniques de quantification par PCR

3.3.2.1. La cinétique de la réaction PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une série de réactions répétées en boucle permettant la réplique d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. La réaction PCR permet l'amplification d'une région spécifique d'une molécule d'ADN donnée jusqu'à obtenir une quantité suffisante pour la détecter et l'étudier.

En conditions idéales, la quantité du produit d'amplification est doublée après chaque cycle de PCR. Le modèle mathématique de la réaction d'amplification est le suivant : $N = N_0 2^n$, où N_0 et N représente respectivement le nombre de molécules d'ADN cible avant et après un nombre n de cycles d'amplification. Cependant, en conditions réelles, l'efficacité de la réaction notée (E) joue un rôle très important dans la cinétique de la réaction PCR et détermine la quantité de produits amplifiés après chaque cycle qui ne doit pas être nécessairement le double du cycle antérieur. La correction de la formule d'amplification PCR en tenant compte de l'efficacité est la suivante : $N = N_0 (1+E)^n$.

Les valeurs d'efficacité sont comprises entre 0 et 1. L'expérience montre que la valeur de l'efficacité est souvent élevée, typiquement d'environ 0,8 à 0,9 (Peccoud, 1993). De nombreux

facteurs peuvent affecter l'efficacité de la réaction PCR, comme la longueur et la séquence du produit, la séquence des amorces et la présence d'impuretés dans l'échantillon (Cross, 1995).

La croissance exponentielle des produits d'amplification ne s'observe pas pendant toute la réaction. Au bout d'un certain nombre de cycles, la croissance exponentielle se ralentit, l'efficacité tend vers zéro de sorte que la quantité de produits atteint une limite, c'est la phase de plateau. Lors de cette phase on observe (1) une forte concentration du produit amplifié donnant lieu à la réassociation des brins d'ADN sans duplication, (2) un ratio entre l'enzyme de polymérisation et l'ADN cible trop faible et (3) l'épuisement d'un ou plusieurs éléments servant à l'amplification.

L'incertitude sur la connaissance du moment exacte auquel la PCR atteint le plateau est considérée comme un handicap dont il faut tenir compte dans le développement de la PCR quantitative (Ferre, 1992).

3.3.2.2. La PCR quantitative

Le but de la PCR quantitative (Q-PCR) est d'estimer le nombre initial N_0 de molécules cibles dans un échantillon, à partir du nombre final de molécules amplifiées N (Cross, 1995). Dans la phase exponentielle de la PCR, le modèle mathématique de la réaction peut être linéarisé en passant au logarithme. On obtient : $\mathbf{Log(N) = Log(N_0) + n Log(1+E)}$.

Cette équation permet l'estimation de N_0 . Pour ce faire, l'échantillon inconnu est divisé en plusieurs aliquotes de taille égale (N_0 fixe) et l'ADN de chaque aliquote est amplifiée pendant un nombre de cycle qui lui est propre (n variable). Les produits d'amplification (N) sont ensuite quantifiés à l'aide d'une des méthodes suivantes : (1) quantification après analyse densitométrique d'image d'un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium et comparaison des intensités des bandes obtenues avec celles d'un marqueur de poids moléculaire (Nakayama et *al.*, 1992 ; Piatak et *al.*, 1993 ; Jenkins, 1994), (2) quantification par la HPLC (High Performance Liquid Chromatography) après intégration numérique des pics de densités optiques à 260 nm en sortie de la colonne (Peccoud, 1993) et (3) quantification par analyse de la densité optique d'une réaction colorimétrique de type ELOSA (Enzyme linked OligoSorbent Assay) (Zammatteo et *al.*, 1995) ou bien ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) commercialisé par la firme Roche.

Après détection et quantification de la quantité finale N de molécules cibles, et en considérant le logarithme de N en fonction du nombre de cycle, il est possible de déterminer N_0 par régression linéaire (Figure 8).

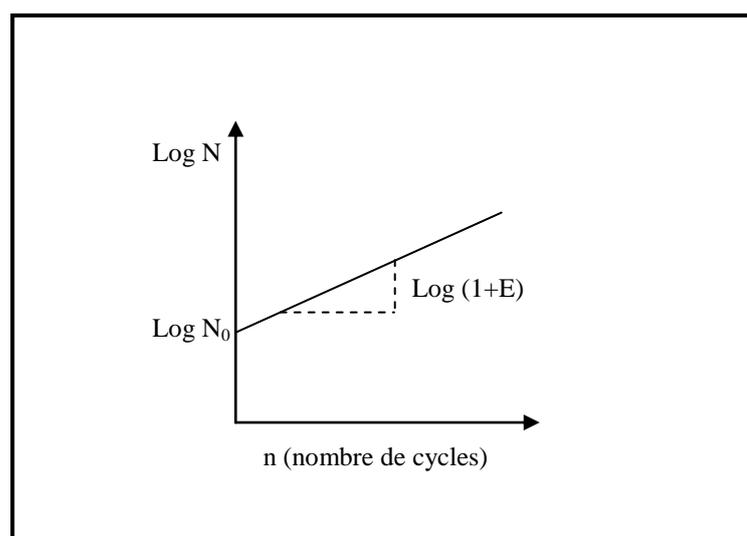


Figure 8 : Détermination de la quantité initiale de séquence cible (N_0) et de l'efficacité d'amplification (E) par une régression linéaire.

Il existe une autre technique de quantification beaucoup plus complexe faisant appel à un standard interne ou compétiteur. Il s'agit de la PCR quantitative compétitive (QC-PCR) (Zimmermann et Mannhalter, 1996). Le standard interne est une séquence d'ADN très proche de la séquence cible et présente les mêmes sites d'amorçage que la cible (Cross, 1995). La QC-PCR est une méthode basée sur la co-amplification de la molécule cible avec une quantité connue d'un standard interne. La quantification est donc réalisée par comparaison entre le signal PCR de la cible et celui de du standard interne. Une quantification fiable et précise par la QC-PCR n'est possible que dans le cas où la cible et le standard interne sont amplifiés avec la même efficacité. Cette technique a déjà été utilisée par Pujol *et al.* (2004) pour quantifier la population d'un agent de biocontrôle *Pichia anomala* souche K, après son application sur fruits de pommes. Rezzonico *et al.* (2003) ont également utilisé la QC-PCR pour le traçage d'un agent de lutte biologique *P. fluorescence* CHOA.

Toutefois, la quantification des agents de lutte biologique par la Q-PCR ou bien la QC-PCR ne semble pas être beaucoup utilisée, probablement à cause des difficultés de mise au point. En effet, les résultats de quantification dépendent fortement des manipulations pré- et post-PCR, à savoir, l'extraction d'ADN et la révélation des produits d'amplification. De plus, il n'est pas toujours évident de définir une relation simple entre le nombre de molécules cibles et le nombre de cellules cibles surtout lorsque la molécule cible est présente en multiples copies dans le génome. Enfin, la PCR présente l'inconvénient de détecter à la fois les cellules mortes et vivantes, ce qui va induire des erreurs de quantification des cellules viables.

Actuellement, une technique appelée PCR en temps réel (Real-time PCR) (Higuchi et *al.*, 1992) et de plus en plus utilisée pour la détection et la quantification des microorganismes. La PCR en temps réel permet une quantification précise de la quantité initiale (N_0) d'ADN cible, car elle mesure l'accumulation des produits PCR en cours de la réaction et non plus à la fin de la réaction. En effet, La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur (reporter) fluorescent (exemple : SYBR Green I, TaqMan, Hybprobes, Molecular Beacons et Scorpion primers). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction d'amplification PCR (Poitras et Houde, 2002).

La PCR en temps réel utilise un système en tubes fermés et ne requiert aucune manipulation post-PCR ce qui minimise ou élimine les problèmes de faux positifs liés à des contaminations par des amplicons PCR et réduit le temps d'analyse (Bustin, 2000). A l'opposé, lors de la PCR classique, les tubes sont ouverts pour réaliser la révélation des amplicons, ces derniers peuvent être libérés dans l'atmosphère et contaminer de nouveaux milieux réactionnels.

La PCR en temps réel s'avère très intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle étant donné que le processus complet est automatisé du début à la fin (Martell et *al.*, 1999). Cette technique a été utilisée avec succès pour le traçage de certains agents de lutte biologique, principalement des champignons, tel que *Plectosphaerella cucumerina* 380408 (Atkins et *al.*, 2003), *Paecilomyces lilacinus* RESP11 et 251 (Atkins et *al.*, 2005), *Trichoderma harzianum* 2413 (Rubio et *al.*, 2005) et *Hirsutella rhossiliensis* OWVT-1 (Zhang et *al.*, 2006), *Trichoderma atroviride* SC1 (Savazzini et *al.*, 2008), et des levures, comme *Aureobasidium pullullans* L47 (Scheda et *al.*, 2002) et *Candida oleophila* O (Massart et *al.*, 2005). Pour les bactéries antagonistes appliquées en lutte biologique, on a trouvé dans la littérature un seul exemple

d'utilisation de la PCR en temps réel comme méthode de traçage, il s'agit de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* EPS62e (Pujol et al., 2006).

3.4. Méthodes de traçage mixtes

Les techniques d'identification et de quantification microbiologiques, directes et moléculaires, décrites ci-dessus, peuvent être combinées entre eux, pour donner naissance à de nouvelles méthodes de traçage dites « **mixtes** » ou « **hybrides** ». Ces combinaisons seront effectuées dans l'objectif de définir la méthode de traçage la plus adéquate et la plus performante pour chaque type d'agent de lutte biologique.

Le choix d'utilisation d'une technique d'identification et de quantification dépend de (1) la connaissance des caractéristiques phénotypiques et génotypiques de la souche cible, (2) des avantages et des inconvénients de chaque techniques, et enfin (3) des moyens techniques et financières disponibles dans chaque laboratoire.

L'utilisation des techniques d'identification et de quantification microbiologiques offre le grand avantage de ne détecter que les cellules viables. Ces techniques malgré qu'elles sont moins rapides, comparées aux techniques directes et moléculaires, elles sont simples à mettre en œuvre et ne nécessite que des équipements et du matériel à faible coût. Néanmoins, les méthodes de traçage classiques présentent un inconvénient : seules les cellules cultivables peuvent être détectées et quantifiées. En effet, il a été démontré que sous certaines conditions environnementales, une faible partie de la population microbienne peut être dans un état viable mais non cultivable (viable but non-culturable cells) (Divol et Lonvaud-funel, 2005 ; De Vos et Nelis, 2006). En cas de présence de ces cellules viables mais non cultivable, la taille réelle d'une population microbienne peut être sous-estimée.

Dans le cas des méthodes de traçage directe, l'estimation de la taille de population de l'agent de biocontrôle, peut être réalisée par : (1) microscopie en fluorescence, (2) spectroscopie de fluorescence et (3) cytométrie en flux. Ces techniques offre le grand avantage de détecter toutes les cellules viables (cultivable et non cultivable), ce qui permet donc une estimation beaucoup plus précise de la taille de population du microorganisme étudié. Toutefois, le principal inconvénient est que ces méthodes requièrent l'utilisation d'agents de biocontrôle génétiquement

modifiés. Néanmoins, la technique de cytométrie en flux a déjà été utilisée comme technique de traçage de certains agents de biocontrôle comme, *P. fluorescens* A506::*gfp* (Tombolini et al., 1997) et *P. fluorescens* SBW25::*gfp* (Maraha et al., 2004).

En ce qui concerne les méthodes de traçage moléculaires, elles exigent des équipements à coût élevé et leur mise en œuvre reste très laborieuse. Néanmoins, une fois développées, les méthodes de traçage moléculaires sont plus sensibles, plus rapides, et peuvent être utilisées pour des analyses en routines. L'inconvénient majeur des méthodes de traçage moléculaires est que tant les cellules mortes que vivantes sont détectées. Ces erreurs de détection engendreront des erreurs de quantification, c'est-à-dire une surestimation de la population des cellules vivantes (Skena et al., 2004).

Afin de surmonter les inconvénients de chacune des méthodes de traçage microbiologiques, directes et moléculaires, on peut les combinées pour obtenir de nouvelles méthodes de traçage mixte ou hybride. Dans la littérature on trouve plusieurs exemples concernant l'utilisation combinée des différentes méthodes de traçage des agents de biocontrôle (Tableau 5). Cependant, la méthode de traçage mixte la plus utilisée par les chercheurs dans le domaine de lutte biologique à base de microorganismes antagonistes, consiste à réaliser un traçage microbiologique par étalement des microorganismes étudiés sur boîtes de Petri contenant un milieu de culture approprié, suivi d'une identification des colonies par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'un marqueur moléculaire, le plus souvent un marqueur SCAR spécifique à la souche cible.

le manque de précision du traçage microbiologique, vis-à-vis du traçage mixte, est en grand part du à une identification erronée du microorganisme cible (bas pouvoir discriminatoire), car l'identification est basée sur des caractères morphologiques, et le plus souvent les souches appartenant à la même espèce présentent les mêmes caractéristiques morphologiques. Dans le traçage mixte l'identification moléculaire des colonies par PCR (haut pouvoir discriminatoire) permet donc d'établir un facteur de correction en détectant les ufc qui ne correspondent pas à la souche ciblée, et par conséquent rehausser la précision du traçage.

Dans ce contexte, De Clercq et al. (2003) ont développé une technique de traçage mixte, permettant de suivre la dynamique de population de *Pichia anomala* souche K, utilisée comme agent de lutte biologique contre les maladies fongiques des pommes en conservation. Dans un

premier temps, un marqueur moléculaire de 2000 pb spécifique à la souche K a été déterminé par la technique RAPD, puis dans un second temps et sur base de séquences de ce marqueur RAPD, un marqueur SCAR de 262 pb a été développé. Une fois ce marqueur identifié une technique de quantification a été mise au point. Cette technique est basée sur l'étalement des micro-organismes récupérés par lavage des pommes traitées au préalable avec *P. anomala* souche K sur un milieu semi-sélectif, suivie d'une identification des colonies par une amplification PCR du marqueur SCAR.

Tableau 5 : Exemples d'utilisation des techniques de traçage mixtes sur des agents de biocontrôle

Espèce	Souche	Identification	Quantification	Référence
Bactéries				
<i>Pseudomonas corrugata</i>	2140	R-Ab, gène <i>lacZ</i> rep-PCR	Comptage ufc	Choi et al., 2003
<i>P. fluorescens</i>	A506	R-Ab	Comptage ufc, CMF	Nucló et al., 1998
<i>P. fluorescens</i>	SBW25	gènes <i>gfp</i> , <i>lux</i>	Comptage ufc, CMF	Unge et al., 1999
<i>P. fluorescens</i>	29A	R-Ab, RAPD	Comptage ufc	Chapon et al., 2002
<i>P. fluorescens</i>	CHAO	gène <i>phlA</i>	Comptage ufc QC-PCR	Rezzonico et al., 2003
<i>P. fluorescens</i>	EPS62e	R-Ab, SCAR	Comptage ufc PCR en temps réel	Pujol et al., 2006
<i>Pantoea agglomerans</i>	CPA-2	RAPD, SCAR	Comptage ufc	Nunes et al., 2008
Levures				
<i>Aureobasidium pullulans</i>	LS30	Morph., AFLP	Comptage ufc	Lima et al., 2003
<i>A. pullulans</i>	L47	RAPD, SCAR	Comptage ufc PCR en temps réel	Schena et al., 2002
<i>Candida oleophila</i>	I-182	gène <i>gus</i>	Comptage ufc	Chand-Goyal et al., 1998
<i>C. oleophila</i>	O	SCAR	Comptage ufc PCR en temps réel	Massart et al., 2005
<i>Cryptococcus laurentii</i>	LS28	Morph., AFLP	Comptage ufc	Lima et al., 2003
<i>Pichia anomala</i>	K	Morph., SCAR	Comptage ufc	De Clercq et al., 2003
<i>Rhodotorula glutinis</i>	LS11	Morph., AFLP	Comptage ufc	Lima et al., 2003
Champignons				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	RESP11, 251	Séquence ITS	Comptage ufc, PCR en temps réel	Atkins et al., 2005
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	380408	Séquence ITS	Comptage ufc PCR en temps réel	Atkins et al., 2003
<i>Trichoderma hamatum</i>	382	RAPD, SCAR	Comptage ufc	Abbasi et al., 1999
<i>Gliocladium catenulatum</i>	J1446	Morph., RAPD, SCAR	Comptage ufc	Paavanen-Huhtala et al., 2000

R-Ab : Résistance aux antibiotiques

Morph : Morphologique

CMF : Cytométrie en flux

3.5. Conclusion

Il ressort de cette recherche bibliographique que diverses techniques d'identification et de quantification des microorganismes sont disponibles, pour plus au moins répondre aux exigences des méthodes de traçage des agents de lutte biologique. Néanmoins, les limitations de chacune de ces techniques, les rendent dans certains cas, insuffisantes pour un diagnostic précis.

En ce qui concerne les techniques d'identification des microorganismes, il paraît que seul le marquage moléculaire peut répondre au besoin de spécificité lié au traçage des souches d'intérêts. Dans ce contexte, la RAPD reste la technique de marquage moléculaire qui jouisse d'une grande popularité auprès des chercheurs intéressés par l'identification des souches antagonistes appliquées en lutte biologique en raison de sa simplicité, de son haut pouvoir de discrimination taxonomique, et de la possibilité de développer des amorces PCR (amorces SCAR) spécifiques à la souche cible à partir des profils d'amplification.

Une fois une technique d'identification par marquage moléculaire de la souche cible est développée, une technique de quantification de la souche antagoniste doit être mise au point pour étudier sa dynamique de population après son application. La technique de quantification classique par comptage des ufc, après isolement des microorganismes sur un milieu de culture sélectif ou bien semi-sélectif, demeure la technique la plus utilisée. Cette technique, quoique moins rapide, elle reste la plus simple à mettre en œuvre et permet de mettre en évidence uniquement les cellules viables. Le couplage de cette technique de quantification avec une technique d'identification par PCR d'un marqueur spécifique à la souche cible (traçage mixte) permet d'augmenter la précision du traçage.

La quantification des agents antagonistes par PCR quantitative, bien qu'elle est plus rapide et plus précise, présente le grand inconvénient de détecter les cellules mortes. En plus, l'interprétation des résultats de quantification n'est pas souvent évidente surtout lorsque les cellules sont poly-nucléées et/ou la molécule cible est présente en multiple copie dans le génome. De ce faite, la plupart des auteurs préconisent l'utilisation des procédures de traçage mixte.

4. AUREOBASIDIUM PULLULANS

4.1. Présentation de l'espèce

L'espèce *Aureobasidium pullulans*, appelée aussi "levure noire", est un champignon levuriforme (yeast-like fungi) appartenant à la Famille des Dothioraceae. Elle a été décrite pour la première fois par de Bary (1866) comme un saprophyte commun des phanérogames et il l'a appelé *Dematium pullulans*. Le même microorganisme a été isolé quelques années plus tard par Viala et Boyer (1891) sur des feuilles de *Vitis vinifera* et ils l'ont appelé *Aureobasidium vitis*. Arnaud (1910) a reconnu que dans les deux cas il s'agissait du même microorganisme et il a suggéré le nom d'*Aureobasidium pullulans*.

La taxonomie de ces levures peut être parfois difficile à cause de leur haut pléomorphisme. En effet, la même souche change de morphologie sous plusieurs instances de l'environnement. Hermanides-Nijhof (1977) a étudié de nouveau cette espèce et il a reconnu l'existence de deux variétés d'*A. pullulans* : *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* et *Aureobasidium pullulans* var. *melanoginum*. Cette dernière est caractérisée par la production de mélanine. Yurlova et De Hoog (1997), ont trouvé une troisième variété, *Aureobasidium pullulans* var. *aubasidani*, différente des deux autres par sa réponse négative à l'assimilation de méthyle- α -D- glucoside et le lactose.

Récemment une étude menée par Zalar et al. (2008), a démontré l'existence de deux nouvelles variétés d'*A. pullulans*, il s'agit d'*A. pullulans* var. *subglaciale* et *A. pullulans* var. *namibiae*. De plus, Zalar et al. (2008) ont aussi redéfini le nom *A. pullulans* var. *aubasidani* comme étant un synonyme d'*A. pullulans* var. *pullulans*.

De point de vue écologique les souches de l'espèce *A. pullulans* sont omniprésentes, elles ont été isolées de substrats et d'échantillons variés (sol, bois, racines, céréales, papier, sédiments marins, eaux...), mais ont les retrouves principalement dans la phyllosphère. Elles sont aussi fréquemment retrouvées sur plusieurs légumes (Webb et Mundt, 1978), et sur des fruits tels que les raisins (Canapé, 1976) et les fraises (Buhagiar et Barnett, 1971). Les *A. pullulans* contribuent à une décomposition rapide de la matière organique à travers la production d'enzymes cellulolytiques, pectinolytiques et lignolytique (Domsh et al., 1980).

L'espèce *A. pullulans* présente une haute tolérance à la dessiccation et aux irradiations (Elad et al., 1994; Köhl et al., 1995), et la plupart des souches de cette espèce présente une haute tolérance à des concentrations élevées en sels et en sucres (De Hoog, 1993).

Les *A. pullulans* présentent un intérêt industriel et économique très important. Ils sont utilisés pour la production d'une large variété de métabolites, des enzymes, des antibiotiques, des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.) et des polysaccharides biodégradables tel que le pullulane, utilisé pour la conservation des aliments et aussi en industrie pharmaceutique (Chi et al., 2009). De plus l'espèce *A. pullulans* a montré un potentiel dans le contrôle et la surveillance de la pollution de l'environnement. Grâce à son omniprésence au niveau de la phyllosphère, tout changement dans sa présence pourrait se révéler être un indicateur de perturbations de l'environnement générées par des produits chimiques ou bien par d'autres organismes biologiques, y compris des organismes génétiquement modifiés, débarquant à la surface des feuilles (Gaur et al., 2010).

4.2. Caractères cultureux

Sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar), *A. pullulans* a une croissance relativement rapide. La température optimale de croissance est comprise entre 22 et 25°C, par contre les *A. pullulans* ne pousse pas à 37°C. Les colonies sont plates, lisses, brillantes, levuriformes, et recouvertes d'un exsudat visqueux. La surface est de couleur rose pâle ou jaune au début et devient brun à noir avec le vieillissement (Figure 9).

4.3. Morphologie microscopique

Les hyphes végétatifs de 3 à 12 µm de large, septés, hyalins (incolores) au départ et devenant brun noirâtre avec l'âge. Certains filaments présentent une paroi plus épaisse et bien foncée produisant des arthroconidies puis des chlamydoconidies en vieillissant. Les blastoconidies, sont unicellulaires (de 7 à 16 µm x 3,5 µm), de forme ovale, hyalines, se développant en grappe de façon synchrone à partir de cellules conidiogènes peu différenciées, intégrées dans les filaments ou disposées en position terminale (Figure 10).

Une fois détachées les blastoconidies bourgeonnent à plusieurs endroits et peuvent donner des chaînettes de spores en courtes chaînes de 2, 3 ou 4 éléments. On trouve aussi des endoconidies formées dans une cellule intermédiaire puis ensuite relarguées par une cellule voisine vide (De Hoog, G.S., 2000).



Figure 9 : Culture d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 (a) et souche 1113-5 (b) sur milieu PDA. La photo a été prise après 7 jours d'incubation à 25°C.

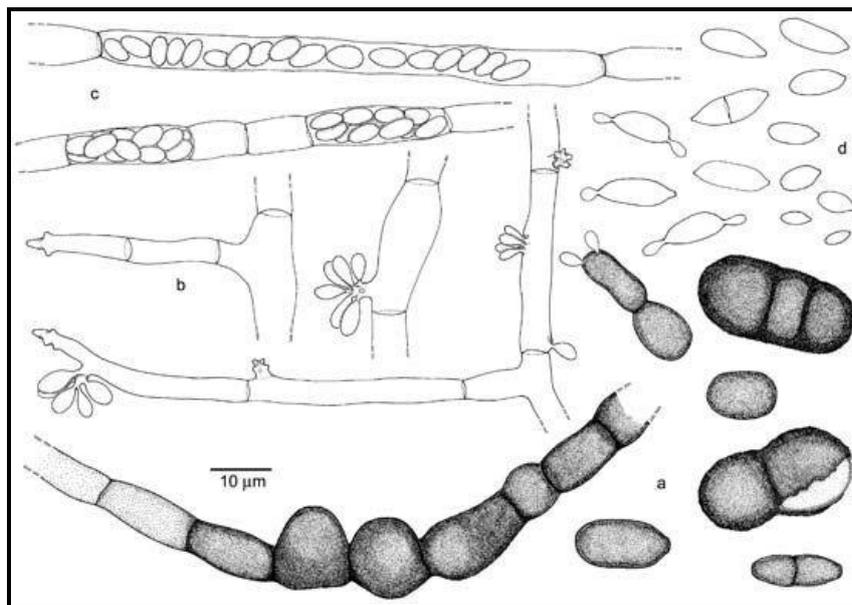


Figure 10 : Morphologie microscopique d'*A. pullulans* CBS 584.75. (a) : chlamydospores intercalaires et libres ; (b) : hyphes avec des conidies synchrones ; (c) : endoconidies ; (d) : conidie (blastoconidies) et bourgeonnement des cellules (De Hoog, G.S. (2000). Atlas of clinical fungi, ed. 2 : 1-1126).

4.4. Utilisation d'*A. pullulans* en lutte biologique

L'espèce *A. pullulans* (de Bary) Arnaud, semble présenter de bonnes potentialités d'utilisation en tant qu'agent de lutte biologique, et ceci en raison de sa capacité à coloniser une large gamme d'hôtes (Webb et Mundt, 1978), ainsi que sa capacité de survie et d'adaptation à différentes conditions environnementales (Köhl et Fokkema, 1994).

L'efficacité de certains isolats épiphytes d'*A. pullulans* dans la prévention des maladies fongiques des fruits et légumes au niveau des chambres de stockage et au niveau des champs a été rapportée par plusieurs auteurs (Leibinger et al., 1997 ; Lima et al., 1997a ; Schena et al., 1999). En effet, cette espèce est considérée comme un agent de biocontrôle efficace contre *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* et *Pezizula malicorticis* sur pommes (Leibinger et al., 1997), contre *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonifer* sur raisins, kiwis et fraises (Lima et al., 1997a).

L'espèce *A. pullulans* a été aussi utilisée, dans une stratégie de lutte intégrée, en combinaison avec des traitements aux rayons UV pour contrôler *B. cinerea* sur kiwi (Nigro et al., 1997). Elle a été également utilisée en combinaison avec un taux réduit de Bénomyl (10 % de la dose recommandée) pour le contrôle des maladies fongiques des pommes en conservation (Lima et al., 1997b et 2003).

Parmi les isolats d'*A. pullulans* présentant une activité antagoniste contre les pourritures de post-récolte, la souche L47 isolée en Italie à la surface de baies de raisins, reste l'une des souches antagonistes les plus efficaces. Cette souche a montré une activité antagoniste contre *B. cinerea* sur fruits de fraises, plus importante que celle généralement obtenu par la Vinclozoline[®], un fongicide fréquemment utilisé pour le contrôle des pourritures dues à *B. cinerea* (Lima et al., 1997a). La même souche a aussi engendré des niveaux de protection importants contre *Penicillium digitatum* sur pamplemousses, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* et *Aspergillus niger* sur raisins de table, *B. cinerea* et *R. stolonifer* sur tomates cerises (Schena et al., 1999). Dans une autre étude menée par Ippolito et al. (2005), l'application de la souche L47, que ce soit en pré- ou en post-récolte, en combinaison avec le chlorure de calcium (CaCl₂) ou le bicarbonate de sodium (NaHCO₃), a permis un contrôle efficace des pourritures de post-récolte des fruits de cerises principalement causées par *B. cinerea*, *Monilia laxa* et *Alternaria alternata*.

L'utilisation potentielle de certains isolats endophytes d'*A. pullulans* comme agents de lutte biologique, a été étudiée pour la première fois par Schena et al. (2003). Parmi ces isolats, les souches 533 et 547, isolées à partir de la chair de fruits de cerises, réduisaient d'une façon significative les pourritures de post-récolte des fruits de cerises et des raisins de table. Plus particulièrement, la souche 547 appliquée en pré- et post-récolte présentait des niveaux de protection comparable à ceux obtenus par le Folicur[®] et le Switch[®], deux fongicides utilisés pour le contrôle des maladies fongiques des cerises et des raisins de table respectivement.

Récemment, deux souches d'*A. pullulans*, CF10 et CF40, isolées en Allemagne à partir de la surface de pommes (Leinbinger et al., 1997), ont été utilisées comme ingrédient actif pour le développement d'un nouveau biopesticide : Blossom Protect FBTM (Kunz, 2004 ; Seibold et al., 2004 ; Kunz et Haug, 2006). Ce biopesticide, commercialisé par la société BioProtect, a été homologué en Allemagne et en Suisse pour le contrôle du feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* sur arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier et cognassier). Le Blossom Protect FBTM présente un degré d'efficacité d'à peu près 80%, proche de celui obtenu par la Streptomycine (Seibold et al., 2004). Deux autres biopesticides ont été aussi développés par la même société, le premier nommé Boniprotect[®] à base de deux souches d'*A. pullulans* a été homologué en Allemagne depuis Septembre 2005 pour la lutte contre les maladies fongiques des pommes en post-récolte causées principalement par *Pezizula* spp., *Nectria gilligena*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* et *Monilia fructigena*, le second nommé Boniprotect[®] forte contient également des souches d'*A. pullulans* a été homologué en Février 2007, il est appliqué pendant la période de floraison pour contrôler *B. cinerea* sur fraises et raisins et *Monilia* spp. sur cerises et prunes.

Concernant nos deux souches antagonistes, la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 d'*A. pullulans*, elles ont été isolées à partir de la surface de pommes Golden Delicious au sein de l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) et au sein de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Meknès respectivement. Elles ont été sélectionnées pour leur activité antagoniste élevée (> 80%) et reproductible contre *B. cinerea* et *P. expansum* à 5°C et 25°C sur fruits de pommes (Achbani et al., 2005 ; Mounir et al., 2007 ; Bencheqroun et al., 2007).

4.5. Mécanismes d'action des souches antagonistes d'*A. pullulans*

La compétition pour les éléments nutritifs et l'espace, est considérée comme le principal mode de biocontrôle des pathogènes fongiques par les isolats antagonistes d'*A. pullulans* (Lima et al., 1997a ; Ippolito et al., 1997). Récemment, des expériences effectuées *in situ* ainsi qu'*in vivo* par Bencheqroun et al. (2007), ont suggéré que la compétition pour les substances nutritives de la pomme, plus particulièrement les acides aminés, est le principal mécanisme de l'activité antagoniste d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 contre la pourriture bleue causée par *P. expansum* sur pommes en conservation.

Une étude menée par Castoria et al. (2001) sur les modes d'action de l'isolat LS-30 d'*A. pullulans*, rapporte que cette souche ne paraît pas produire des substances antibiotiques, en plus l'interaction directe de ses cellules avec les hyphes du pathogène n'est pas impliquée dans son activité antagoniste, alors que la production des β -1,3-glucanases pourrait réellement jouer un rôle dans les propriétés antagonistes de la souche LS-30.

Une autre étude effectuée par Ippolito et al. (2000), sur les modes d'action d'*A. pullulans* appliquée comme antagoniste contre *B. cinerea* et *P. expansum* sur pommes en conservation, rapporte qu'*A. pullulans* est capable d'induire l'accumulation de chitinases, de β -1,3-glucanases, et de peroxydases au niveau des sites blessés de fruits de pommes. Cependant, on a pas prouvé que ces enzymes détectées dans les blessures traitées par cette levure étaient originaires de l'hôte, puisque l'espèce *A. pullulans* était aussi capable de produire la β -1,3-glucanase et la chitinase (Castoria et al., 1997).

4.6. Production en masse et formulation d'*A. pullulans* souche Ach 1-1

L'aptitude à la production en masse et à la préparation d'une formulation sèche de l'agent antagoniste *A. pullulans* souche Ach 1-1 a été étudiée à l'Unité de Biotechnologie de l'Université Libre de Bruxelles (Belgique). La souche Ach 1-1 a été produite en masse dans un fermenteur à fed-batch (106 g de poids sec /L en 48 heures), puis séchée par la technique du séchage en lit fluidisé avec une viabilité finale de 62%. Ce processus de production n'a pas affecté l'activité antagoniste de la souche Ach 1-1 vis-à-vis de *P. expansum* sur pomme (Mounir et al., 2007).

5. CONCLUSION

L'augmentation des inquiétudes publiques et politiques liées à l'utilisation des fongicides chimiques, plus particulièrement leurs impacts potentiels sur la santé humaine et sur l'environnement, ainsi que l'apparition de souches résistantes à certaines matières actives ou même à des familles de fongicides, et les conditions législatives de plus en plus restrictives au sujet de leur utilisation, ont mené à un intérêt croissant pour la recherche de stratégies alternatives permettant le contrôle des maladies fongiques des fruits en post-récolte.

Le biocontrôle des maladies fongiques de post-récolte au moyen de microorganismes antagonistes se présente comme une alternative attractive à la lutte chimique. Toutefois, cette approche de lutte biologique ne semble pas actuellement être une alternative capable de remplacer totalement la lutte chimique, néanmoins elle peut être utilisée dans le cadre d'une lutte intégrée rendant l'utilisation des fongicides chimiques de plus en plus restreinte.

Ces vingt dernières années, différents types de microorganismes : bactéries, champignons filamenteux, et levures, ont été isolés pour leur activité antagoniste vis-à-vis des pathogènes fongiques des fruits en conservation. Certains d'entre eux ont été utilisés pour développer des biopesticides commerciaux tels que : Bio-Save[®] 10LP et 11LP (*Pseudomonas syringae* : JET Harvest Solutions, USA), Yield Plus[™] (*Cryptococcus albidus* : Anchor Yeast, Afrique du Sud), Candifruit[™] (*Candida sake* : SIPCAM-INAGRA S.A., Spain), Serenade[™] (*Bacillus subtilis* : AgraQuest, CA, USA).

Au Maroc, concernant l'utilisation d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5 comme agents de lutte biologique contre les maladies fongiques des pommes en post-récolte, ainsi que la possibilité de leur production en masse et leur commercialisation, les résultats des travaux de recherche menés sur ces deux souches et principalement sur la souche Ach 1-1 semblent être encourageants. En effet, les souches Ach 1-1 et 1113-5 ont été isolées de la surface des pommes Golden Delicious et sélectionnées pour leur activité protectrice élevée et reproductible contre *B. cinerea* et *P. expansum* (Achbani et al., 2005 ; Mounir et al., 2007 ; Bencheqroun et al., 2007). Ces deux souches de levures ne présentent aucune croissance à 37°C, elles ne sont pas donc capables de pousser à la température du corps humain (Achbani, communication personnelle).

La souche Ach 1-1 a été facilement produite en masse dans un fermenteur à fed-batch (106 g de poids sec/L en 48 heures). Après séchage en lit fluidisé elle a présenté une viabilité finale de 62%. Ce processus de production en masse et de séchage développé par Mounir et *al.* (2007) n'as pas affecté l'activité antagoniste de la souche Ach 1-1 vis-à-vis de *P. expansum*, et il a été adopté pour la production en masse de cet agent de biocontrôle. Concernant le mode d'action, la compétition pour les substances nutritives de la pomme, plus particulièrement les acides aminés, a été suggérée par Bencheqroun et *al.* (2007) comme étant le principal mécanisme de l'activité antagoniste d'*A. pullulans* souche Ach 1-1.

De nombreux auteurs ont rapporté que certaines souches d'*A. pullulans* présentent des potentialités importantes comme agents de biocontrôle des maladies fongiques de post-récolte des fruits et légumes, avec possibilité d'utilisation de ces souches antagonistes en combinaison avec de faibles quantités de pesticides chimiques dans une stratégie de lutte intégrée (Leibinger et *al.*, 1997 ; Lima et *al.*, 1997a ; Schena et *al.*, 1999 ; Lima et *al.*, 1997b). Récemment un biopesticide « Blossom Protect FB™ » à base de deux souches d'*A. pullulans* a été mise en vente sur le marché Allemand et Suisse pour le contrôle du feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* sur arbres fruitiers à pépins. De plus deux biopsticides à base de souches d'*Aureobasidium pullulans* « BoniProtect® et BoniProtect® forte », ont été homologués et commercialisés en Allemagne pour le contrôle des maladies fongiques de post-récolte de pommes pour le premier produit et des fraise, cerises et prunes pour le second produit.

Toutefois, le développement d'un biopesticide à base de nos deux souches antagonistes (Ach 1-1 et 1113-5) et sa commercialisation à grande échelle, nécessite l'optimisation des conditions de production en masse, de la formulation et du mode d'application. Ces étapes ne peuvent être étudiées et voir leur efficacité s'améliorer que si l'on se dote d'un outil de traçage permettant d'évaluer et de suivre la dynamique de population de nos deux agents antagonistes après leur application.

Le traçage va donc permettre de détecter et d'identifier la souche antagoniste de façon spécifique dans l'environnement où elle a été introduite, il va permettre également de suivre le niveau de développement de la population de la souche d'intérêt en fonction du temps et en fonction des conditions environnementales.

Dans l'étude bibliographique portant sur les techniques d'identification et de détection des microorganismes, il paraît que seul le marquage moléculaire peut répondre aux exigences de spécificité liées au traçage d'une souche antagoniste. Dans ce contexte, la technique de marquage moléculaire RAPD reste de loin la technique la plus utilisée en raison de sa simplicité, de son haut pouvoir de discrimination taxonomique, et de la possibilité de développer des amorces PCR (amorces SCAR) spécifiques à la souche cible à partir des profils d'amplification. Toutefois, il est indispensable d'associer à ces techniques de marquage moléculaire une technique d'isolement et de quantification des microorganismes d'intérêt, généralement au moyen d'un milieu de culture semi-sélectif, afin de pouvoir suivre la dynamique de leurs populations.

Chapitre II :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

« On ne peut se passer d'une méthode pour se mettre en quête de la vérité des choses ».
[René Descartes]

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1.1. Souches de levures et conditions de culture

Une collection contenant 15 souches de levures appartenant à l'espèce *Aureobasidium pullulans* a été constituée. Les souches Ach 1-1, Ach 2-1, Ach 2-2, 1113-5 et 1113-10 ont été isolées à partir de la surface des pommes Golden Delicious pour leur activité antagoniste élevée (>80%) contre *B. cinerea* et *P. expansum* (Achbani et al., 2005). Les souches MUCL proviennent de la collection de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve. De plus, huit autres souches de levures appartenant à quatre espèces différentes ont été acquises. Le tableau (6) reprend l'ensemble des acquisitions et leurs substrats d'origine.

Les souches de levures ont été maintenues à 4°C sur boîtes de Petri contenant le milieu *Potato Dextrose Agare* (PDA, Merck). Pour une conservation à long terme, elles ont été également suspendues dans une préparation de glycérol à 25% puis stockées à -80°C. Avant utilisation, et afin d'assurer une activité métabolique optimale, les souches de levures ont été successivement repiquées trois fois sur milieu PDA et incubées à 25°C. L'intervalle entre deux repiquages est de 48 heures.

1.2. Matériel végétal

Les pommes utilisées appartiennent à la variété Golden Delicious. Les fruits originaires du Maroc provenaient du commerce et ont été conservés en chambre froide à 4°C à l'obscurité avant utilisation.

Tableau 6 : Origines et sources des souches de levures utilisées

Espèce	Souche	Substrat d'origine	Source
<i>A. pullulans</i>	Ach 1-1	Pomme, Golden Delicious (Belgique)	Unité de phytopathologie (FUSAGx, Belgique)
	Ach 2-1		
	Ach 2-2		
	MUCL 22377	Feuilles, <i>Quercus robur</i> (Suède)	MUCL (Louvain-la-Neuve, Belgique)
	MUCL 20326	Feuilles, <i>Hordeum sativum</i> (Belgique)	
MUCL 20322	Tuiles (Pays Bas)		
	MUCL 6147	<i>Picea abies</i> (Norvège)	
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	MUCL 7862	Cupule, <i>Fagus sylvatica</i> (Belgique)	INRA (Meknès, Maroc)
	1113-5	Pomme, Golden Delicious (Maroc)	
	1113-10		
	1206-5		
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	MUCL 8724	Sol (Zaire)	MUCL (Louvain-la-Neuve, Belgique)
	MUCL 19714	Fruit, <i>Symphoricarpos rivularis</i> (Suède)	
	MUCL 19360	Arbre, <i>Xyloterus lineatus</i> (Belgique)	
	MUCL 43163	Feuilles et tiges, <i>Citrus sinensis</i> (Brésil)	
<i>Pichia anomala</i>	K	Pomme, Golden Delicious (Belgique)	Unité de phytopathologie (FUSAGx, Belgique)
	J121	Cereals	Département de Microbiologie (SUAS, Suède)
<i>Candida oleophila</i>	O	Pomme, Golden Delicious (Belgique)	Unité de phytopathologie (FUSAGx, Belgique)
	I-128	Pomme	Aspire™ (Ecogen, Langhorne, USA)
<i>Candida sake</i>	CBS 2213	Inconnu	CBS-KNAW (Utrecht, Pays Bas)
	CBS 159	Inconnu	
<i>Debaryomyces Hansenii</i>	MUCL 29030	Fromage Français	MUCL (Louvain-la-Neuve, Belgique)
	MUCL 29907	Peau de l'Homme	

CBS : Centraalbureau voor Schimmelculturen

FUSAGx : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

MUCL : Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain La Neuve

SUAS : Swedish University of Agricultural Sciences

2. MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES

2.1. Récupération des microorganismes par lavage de la surface des pommes

La récupération des microorganismes à la surface des pommes a été réalisée selon une procédure de lavage optimisée à l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) (De Clercq et *al.*, 2004). Ainsi, chaque pomme a été introduite individuellement dans un sac plastique de 1000 ml contenant 300 ml du tampon de lavage KPB (0,016 M K₂HPO₄ ; 0,034 M KH₂PO₄ ; 0,05% Tween 80 ; pH 6,5). Les sacs plastiques fermés ont été placés sous agitation pendant 60 min à 120 tours/min.

2.2. Préparation des suspensions des souches Ach 1-1 et 1113-5

Cinq ml d'eau isotonique (NaCl 0,85%) ont été déposés dans une boîte de Petri contenant la souche Ach 1-1 ou la souche 1113-5 sur milieu PDA. Les colonies ont été mises en suspension en grattant la surface du milieu de culture avec une tige de verre coudée. La suspension a été récupérée et homogénéisée. La concentration des suspensions (ufc/mL) des deux souches étudiées a été calculée grâce à une cellule de Bürker en comptabilisant les ufc présentes dans 10 petits carrés et en multipliant la moyenne obtenue par le facteur 25x10⁴, ou bien par utilisation de deux droites d'étalonnage établies pour la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 mettant en relation la densité optique (DO) à 595 nm de la suspension et le nombre d'ufc par millilitre. Les équations des deux droites d'étalonnages utilisées respectivement pour le calcul de la concentration de la suspension des deux souches Ach 1-1 et 1113-5 étaient les suivantes :

$$1) [\text{souche Ach 1-1}] = 10^7 \times (\text{DO}_{595 \text{ nm}} - 0,0886) / 3$$

$$2) [\text{souche 1113-5}] = 10^7 \times (\text{DO}_{595 \text{ nm}} - 0,1252) / 2$$

Ces deux droites d'étalonnage ont été établies par Dr. H. Achbani (INRA, Meknès).

2.3. Développement d'un milieu de culture semi-sélectif

2.3.1. Premier criblage des fongicides et antibiotiques

Au total huit fongicides habituellement utilisés dans la protection contre les maladies fongiques des pommes en conservation et six antibiotiques ont été choisis et testés séparément à différentes concentrations. Le tableau (7) reprend, pour chaque fongicide et antibiotique les concentrations testées. L'annexe (1) représente le nom des matières actives contenues dans les formulations commerciales, leurs modes d'actions et le spectre des agents pathogènes de chaque matière active.

Les solutions de matières actives ont été incorporées au milieu de base PDA refroidit à environ 50°C. Après homogénéisation, environ 25 mL ont été coulés par boîte de Petri. La préparation des milieux, ainsi que l'incorporation des solutions des matières actives et le coulage sur boîtes de Petri ont été effectuées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

Tableau 7 : Concentrations des fongicides et antibiotiques testés

Type de produit	Nom commercial	Concentrations testées (mg/L)	Code
Fongicides	Sumico	1; 1,5; 5; 10; 25; 50; 100	Su
	Fungaflor	0,25; 0,5; 1; 5; 10	Fu
	Lirotect	2,5; 5; 10; 25	Li
	Captane	0,5; 1	Ca
	TMTD	0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,5	Tm
	Topsin	0,5; 1; 5	To
	Pelt 44	0,5; 1; 5	Pe
	Euparen	0,1; 0,25; 0,5; 1	Eu
Antibiotiques	Cycloheximide	0,1; 0,25; 0,5; 2,5; 5; 10	Cy
	Généticine	2,5; 5; 10; 25; 50; 100	Ge
	Hygromycine B	5; 10; 50; 100	Hy
	Tétracycline	10; 25; 50	Te
	Spectinomycine	10; 25; 50	Sp
	Streptomycine sulfate	10; 25; 50	St

Afin d'évaluer la toxicité des différentes concentrations d'une matière active, 100 µL d'une suspension de la souche Ach 1-1 à une concentration de 10^3 cellules/mL ont été étalés sur chaque milieu contenant une concentration donnée de matière active ainsi que sur milieu PDA seul (témoin). Pour chaque concentration de matière active testée on a réalisé 4 répétitions. Les boîtes ont été incubées à 25°C et les observations (comptage des colonies) ont porté sur une semaine. Les taux de survie exprimés en pourcentage ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = [(\text{ufc sur milieu testé}) / (\text{ufc sur milieu PDA})] \times 100$$

2.3.2. Combinaison des matières actives

Après un premier criblage, et dans le but d'élargir le spectre d'action du milieu semi-sélectif, les fongicides et antibiotiques sélectionnés comme non toxique (taux de survie $\geq 90\%$) vis-à-vis de la souche Ach 1-1 ont été par la suite testés dans des combinaisons ternaires, quaternaires et quinquénaires. Pour chacune des combinaisons testées on a utilisé respectivement 100%, 50% et 25% des concentrations retenues pour chaque matière active. Pour chaque combinaison de matières actives testées on a réalisé quatre répétitions.

2.3.3. Évaluation de la sélectivité des milieux

Afin d'évaluer la sélectivité des différentes combinaisons de matières actives vis-à-vis de la microflore de l'air, trois boîtes de chaque milieu testé ainsi que le milieu PDA seul ont été laissées ouvertes pendant trois heures sur la paillasse du laboratoire. D'autre part, la sélectivité de chaque combinaison a été aussi testée vis-à-vis de la microflore de la surface des pommes. Pour cette fin, quatre pommes ont été lavées individuellement selon la procédure décrite au paragraphe 2.1. Après lavage, 3 ml d'eau de lavage de chaque pomme ont été prélevés et mélangés dans un seul tube. La suspension obtenue a été diluée trois fois dans le tampon de lavage KPB. Cent µL de la suspension diluée ont été étalés sur chaque milieu testé y compris PDA seul (quatre répétitions par milieu). Toutes les boîtes ont été incubées pendant une semaine à 25 °C, et les différentes colonies issues de la microflore de l'air ou de la surface des pommes ont été observées visuellement et comptées.

Une fois un milieu de culture semi-sélectif développé pour la souche Ach 1-1, sa toxicité a été évaluée vis-à-vis de la souche 1113-5.

3. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Toutes les manipulations de biologie moléculaire ont été réalisées au l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

3.1. Extraction de l'ADN génomique des levures

Les souches de levures ont été mises en culture dans 10 mL de milieu YEPD (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% dextrose, Merck) puis incubées pendant 24 h à 25 °C sous agitation. L'extraction de l'ADN génomique des différentes souches de levures (Tableau 6) a été réalisée selon la technique d'Ausubel et *al.* (1987) avec certaines modifications. Les cultures de cellules ont été centrifugées à température ambiante pendant 10 min à 3000 rpm (Sorval GSA rotor) et le surnageant a été éliminé. Chaque culot de cellules a été rincé dans 500 µL d'eau distillée stérile avant d'être centrifugé une minute à 15 700 g. Après, deux rinçages successifs, les culots ont été remis en suspension dans 200 µL de Breaking buffer (2% Triton 100X ; 1% SDS ; 100 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl à pH 8 ; 1 mM EDTA à pH 8).

Les suspensions de cellules ont été vortexées pendant 20 min en présence de 0,3 g de billes de verre (425-600 µm, Sigma) et 200 µL d'un mélange de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25/24/1), puis centrifugées pendant 5 min à 15 700 g à 4°C après addition de 200 µL de tampon TE 1X (10 mM Tris-HCl ; 1mM EDTA ; pH 8). La phase aqueuse a été récupérée et l'ADN génomique est précipité par de l'éthanol absolu glacé (-20°C). Le culot d'ADN a été remis en suspension dans 400 µL du TE 1-X puis incubé durant 30 min à 55°C et 2 min à 37°C en présence de la désoxyribonucléase-free ribonucléase à (1 mg/mL). L'ADN est alors précipité à l'éthanol absolu glacé (2 V) en présence d'une solution d'acétate d'ammonium 4 M (1/10 V), repris dans 50 µL du TE 1X et conservé à -20°C.

La préparation des différentes solutions utilisées lors de l'extraction de l'ADN génomique est présentée en Appendice 2.

3.2. Extraction d'ADN de la microflore épiphytique des pommes

Trois cents mL d'eau de lavage d'une pomme Golden Delicious, obtenus selon la procédure décrite au paragraphe 2.1., ont été filtrés avec un filtre de 0,45 µm de diamètre (Supor[®], Gelman Sciences, Ann Harbor, USA). Les cellules ont été récupérées du filtre dans un grand eppendorf de deux mL avec 1,5 mL du tampon KPB, puis centrifugées pendant 15 min à 15 700 g. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 50 µL de tampon TE 5X (50 mM Tris-HCl ; 5 mM EDTA ; pH 8). Après avoir ajouté 100 µL de solution de lyse (0,2 M NaOH, 1% SDS) le mélange a été incubé pendant 30 min à 100°C dans un bain marie et vortexé toutes les 10 min. La condensation a été récupérée par une brève centrifugation et 75 µL de tampon de précipitation (60 mL d'Acétate de potassium (CH₃COOK) 5 M + 11,5 mL d'Acide acétique (CH₃COOH) + 28,5 mL d'H₂O distillée) ont été ajoutés. Après une incubation de 10 min sur glace le mélange a été centrifugé à 15 700 g pendant sept min et le surnageant a été récupéré. L'ADN est alors précipité à l'éthanol absolu glacé (2 V) en présence d'une solution de NaCl 4 M (1/10 V), puis repris dans 50 µL du TE 1X et conservé à -20°C.

3.3. Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN extrait

La quantification et la vérification de la qualité d'ADN extrait ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre de type : Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). La concentration d'ADN des échantillons a été estimée par lecture de DO (densité optique) à une longueur d'onde de 260 nm, sachant qu'une DO de 1 correspond à 50 µg/mL d'ADN bicaténaire (Maniatis et *al.*, 1989). La valeur obtenue a été corrigée par le facteur de dilution appliqué. La pureté des échantillons a été évaluée en faisant le rapport DO 260 nm/DO 280 nm, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

Après dosage, les solutions mères d'ADN des différentes souches de levures ont été stockées à une température de -20°C, ainsi que des aliquotes de 10 ng/µL. Ces dernières ont été utilisées pour l'analyse en RAPD et en PCR classique afin d'éviter les cycles de gel/dégel de la solution mère.

3.4. Marquage moléculaire par RAPD

3.4.1. Principe de la RAPD

Le principe consiste à réaliser une réaction PCR sur l'ADN génomique de l'individu étudié en utilisant une seule amorce arbitraire de taille courte (10 bases) et en conditions peu stringentes. L'amorce RAPD va s'hybrider chaque fois qu'elle trouvera dans l'ADN matrice une séquence qui lui est complémentaire. Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (100 à 3000 nucléotides de distance) et en opposition, il y'aura amplification exponentielle du brin d'ADN compris entre les amorces. Lorsqu'un des deux sites est absent, il n'y aura pas d'amplification PCR et un polymorphisme de présence ou absence sera observé (Williams et *al.*, 1990).

3.4.2. Choix et sélection des amorces

Au cours de la réalisation de notre travail, 99 amorces RAPD (39 amorces pour la souche Ach 1-1 et 60 amorces pour la souche 1113-5) ont été testées. Le choix des amorces utilisées a été effectué d'une manière aléatoire dans " les kits k, M, N, O, P, Q, R, S, T " (cf. Annexe 2). Ces Kits ont été livrés par la firme Operon Technologies, Inc (Alameda, California). Les amorces étés sous forme solide (lyophilisées), la mise en solution a été faite dans de l'eau distillée stérile avec la plus grande précaution pour éviter toute sorte de contamination.

Les amorces RAPD ont été pré-sélectionnées sur base de comparaison du profil obtenu chez la souche cible (Ach 1-1 ou 1113-5) et deux autres souches appartenant à la même espèce. Pour la souche Ach 1-1, il s'agissait des souches Ach 2-1 et Ach 2-2. Pour la souche 1113-5, la pré-sélection a été réalisée avec la souche Ach 1-1 et la souche 1113-10. Les amorces donnant au moins un produit d'amplification spécifique à la souche cible ont été ensuite évaluées sur la totalité des souches de notre collection.

Dans le but de s'assurer de la reproductibilité des résultats, les amorces sélectionnées ont été testées trois fois successivement sur des préparations d'ADN différentes.

3.4.3. Conditions d'amplification PCR pour la RAPD

Toutes les réactions RAPD ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 1 U de l'enzyme Taq DNA polymérase (Sigma-Aldrich, Inc., USA), 2,5 µL du Tampon PCR 10X (Sigma-Aldrich, Inc., USA), 100 µM de chaque dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de l'amorce RAPD et 50 ng d'ADN génomique. Pour chaque réaction d'amplification un témoin négatif contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN a été réalisé afin de visualiser d'éventuelles contaminations (faux positifs).

Les cycles d'amplification ont été réalisés dans un thermocycleur de type : PTC 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA) selon le programme thermique décrit au tableau (8). Après amplification, les échantillons ont été ensuite placés à 4 °C jusqu'à leur analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.

Tableau 8 : Régime thermique de la réaction RAPD

	Température (°C)	durée	Nombre de cycles
Dénaturation	94	5 min	1
Dénaturation	94	15 sec	44
Hybridation	36	45 sec	
Élongation	72	1 min 30 sec	
Élongation finale	72	10 min	1

3.4.4. Analyse des produits d'amplification

Des aliquotes de 10 µL de chaque échantillon, ont été déposées sur gel d'agarose (1,5 %) préparé dans un tampon TBE 1X (89 mM Tris-Borate ; 2 mM EDTA ; pH 8). L'électrophorèse a été effectuée sous une intensité constante de 80 ou de 120 mA pendant 2 à 3 heures.

La visualisation des fragments d'ADN amplifiés a été faite par coloration du gel au bromure d'éthidium (1µg/mL) et observation sous lumière UV. La taille des produits d'amplification a été estimée par rapport à celle des différents fragments du marqueur de taille Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermantas).

3.5. Conversion des marqueurs RAPD en marqueurs SCAR

3.5.1. Éluion des bandes spécifiques à partir du gel d'agarose

Après migration par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, les fragments d'intérêt ont été excisés du gel d'agarose sous UV à l'aide d'un scalpel stérile, puis ils ont été purifiés en suivant les instructions du Kit "QIAEX II Agarose Gel Extraction" (Qiagen, Germany).

Avant de procéder à leur clonage, une aliquote de 6 µL du produit purifié a été testée sur gel d'agarose (1,5%) afin de vérifier sa taille et d'estimer sa quantité en comparant l'intensité de la bande extraite avec celle d'un marqueur de poids moléculaire Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fermantas).

3.5.2. Clonage moléculaire des bandes spécifiques

Le clonage des fragments d'ADN purifiés a été réalisé au moyen du kit "TA Cloning®" (Invitogen, USA). Ce kit offre une méthode rapide pour l'insertion directe d'un produit PCR dans un vecteur. Dans notre cas le plasmide pCR® 2.1 (cf. Annexe 3) a été utilisé comme vecteur de clonage. Le clonage a été effectué en 3 étapes : (1) ligation, (2) transformation et (3) sélection de clones recombinants.

3.5.2.1. Ligation des fragments au vecteur pCR® 2.1

La ligation consiste à insérer les fragments PCR dans un vecteur de clonage (plasmide pCR® 2.1). En suivant les instructions du kit "TA Cloning®", un volume de 1 à 2 µL de fragments d'ADN purifiés a été utilisé par réaction de ligation. Cette dernière a tiré profit de l'activité transférase terminale de la Taq DNA polymérase. En effet, lors d'une réaction PCR, la Taq DNA polymérase additionne à la fin de l'élongation un désoxyadénosine (dATP) terminal non apparié à un désoxythymidine (dTTP) aux extrémités 3' du fragment amplifié. Cette particularité permet une ligation directe et efficace des produits PCR avec le plasmide pCR® 2.1 linéarisé portant un désoxythymidine non apparié à ses extrémités 3' (cf. Annexe 3).

3.5.2.2. Transformation des cellules compétentes

La transformation des cellules compétentes *Escherichia coli* souche INV α F' fournies avec le Kit "TA Cloning[®]" a également été entreprise conformément aux instructions du kit. Elle consistait à introduire les plasmides pCR[®] 2.1 (recombinant ou non) dans les cellules bactériennes.

Après leur transformation, les cellules ont été étalées sur des boîtes de Petri contenant le milieu NZY-agar (cf. Appendice 1) dans lequel on a additionné 100 μ g/mL d'ampicilline, 23,8 μ g/mL d'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) et 40 μ g/mL d'X-Gal (5'-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) (cf. Appendice 2). L'incubation des boîtes a été faite pendant au moins 18 heures à 37°C, suivie d'une deuxième incubation durant au moins trois heures à 4°C.

3.5.2.3. Sélection des colonies recombinantes

Le plasmide pCR[®] 2.1, utilisé dans la transformation, présente un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un fragment de l'opéron lactose contenant le promoteur et le gène Lac Z codant pour la β -galactosidase. C'est dans ce dernier que se situe le site d'insertion des ADN exogènes. Cette insertion a pour résultat l'inactivation du gène lac Z et donc une altération de l'activité enzymatique de la β -galactosidase. L'IPTG joue le rôle d'inducteur de l'opéron lactose induisant la synthèse de la β -galactosidase. Cette enzyme hydrolyse la X-Gal (substrat incolore) permettant ainsi la libération du galactose et d'un dérivé indole bleu et insoluble.

Ainsi les colonies bactériennes qui se développent sur le milieu NZY-agar + ampicilline + IPTG + X-Gal sont bleues pour les bactéries transformées avec les plasmides non recombinants et blanches pour celles ayant incorporé des plasmides recombinants. Les bactéries qui n'ont incorporé ni plasmide sauvage ni plasmide recombinant ne peuvent pas se développer sur ce milieu.

3.5.3. Purification des ADN plasmidiques recombinants (minipréparation)

Les colonies blanches, résultant de l'inactivation du gène Lac Z, ont été sélectionnées comme recombinantes. Pour chaque transformation, quatre colonies recombinantes ont été repiquées séparément dans 5 mL de milieu liquide NZY (21 g/L) additionné d'ampicilline (100 μ g/mL) et mises en culture pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 850 μ L de la culture ont été déposés dans 150 μ L de glycérol afin d'être conservés à -80°C. D'autre part, le plasmide

recombinant présent dans les cellules a été extrait et purifié à partir de 1,5 mL de la culture de nuit en suivant le protocole du kit “ULTRAPrep[®] Plasmid DNA Mini Prep” (AHN Biotechnologie GmbH, Germany).

Après cette étape d'extraction des ADN plasmidiques recombinants, la vérification de la taille des inserts clonés a été réalisée par une amplification PCR en utilisant les amorces T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) et M13 reverse (CAGGAAACAGCTATGAC). Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose (1,5%) coloré au bromure d'éthidium et visualisés par fluorescence sous UV. La taille des amplicons doit être égale à la taille de l'insert cloné plus 175 pb (cf. Annexe 3). Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 50 µL, contenant 1 U de l'enzyme Taq DNA polymérase (Sigma-Aldrich, Inc, USA), 5 µL du Tampon PCR 10X (Sigma-Aldrich, Inc, USA), 200 µM de chaque dNTP, 1 ng /µL de chaque amorce (T7 et M13 reverse) et 2 ng d'ADN plasmidique. Les réactions d'amplification PCR ont été réalisées dans un thermocycleur de type : PTC 200 selon le régime thermique suivant : 94°C – 5 min ; [94°C – 30 sec ; 52°C – 45 sec ; 72°C – 60 sec] x 30 ; 72°C – 5 min.

3.5.4. Séquençage des fragments et analyse bioinformatique

Les fragments clonés ont été séquencés en utilisant le Kit “BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, USA) selon le protocole décrit par la firme. Pour chaque échantillon, deux réactions de séquençage ont été réalisées, une avec l'amorce T7 et l'autre avec l'amorce M13 reverse. Le milieu réactionnel de chaque échantillon contenait 0,7 µL de l'amorce T7 ou l'amorce M13 reverse à 10 µM, 2 µL de BigDye Terminator V3.1, 1 µL d'ADN plasmidique recombinant (miniprep) et 7,3 µL d'eau distillée stérile. Pour l'amplification PCR le régime thermique suivant a été appliqué : [96°C – 10 sec ; 50°C – 5 sec ; 60°C – 4 min] x 25.

La migration des réactions de séquençage a été réalisée par la société Progenus S.A. (Gembloux, Belgique) et la société GATC Biotech (Konstanz, Germany). Les séquences obtenues, pour chaque fragment, ont été alignées et corrigées en utilisant le logiciel **DNAMAN** (Version 5.2.2, Lynnon BioSoft, Quebec, Canada) et le logiciel libre **ClustalW** (Thompson et *al.*, 1994) disponible sur le site : (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été alignées contre les séquences déposées dans les bases de données internationales (GenBank) grâce au logiciel **MegaBLAST** (Zhang et *al.*, 2000)

du National Center for Biotechnologies Informations (NCBI) (www.ncbi.nih.gov). Cette analyse avait pour objectif de rechercher d'éventuelles similarités entre nos séquences et d'autres séquences déjà déposées dans les banques de séquences internationales. Par la suite, nos séquences ont été déposées sur la banque de séquences GenBank pour pouvoir obtenir un numéro d'accèsion pour chaque une de nos séquences.

3.5.5. Choix et conception des amorces SCAR

Les séquences obtenues nous ont servi de base pour la conception d'amorces SCAR spécifiques à nos deux souches étudiées Ach 1-1 et 1113-5. Les amorces SCAR ont été conçues soit par prolongement des amorces RAPD au niveau des bordures droites et gauches des séquences des fragments RAPD spécifiques à chacune de nos deux souches cibles, ou bien elles ont été sélectionnées en utilisant le logiciel **Primer3** (Rozen et Skaletsky, 2000) disponible sur le site suivant : <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Pour une séquence donnée le logiciel **Primer3** recherche les meilleurs couples d'amorces PCR ou les meilleures amorces « sens » et « anti-sens » de façon indépendante.

Les critères utilisés pour la sélection des amorces SCAR sont les suivantes : 18 à 27 nucléotides, 40 à 60% de GC, taille de l'amplicon de 100 à 700 pb, différence de T_m (température de fusion) ou bien de T_a (température d'hybridation) ne doit pas excéder 2 à 3°C entre les deux amorces, éviter une concentration trop importante d'un seul nucléotide afin d'empêcher la formation de structures secondaires, toute complémentarité entre les deux amorces doit être évitée.

Les propriétés physico-chimiques des amorces ont été déterminées par un logiciel spécialisé **Oligo Calculator** (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

3.5.6. Évaluation de la spécificité des couples d'amorces SCAR

La spécificité des couples d'amorces SCAR vis-à-vis des souches cibles Ach 1-1 et 1113-5 a été évaluée par PCR sur l'ADN génomique de la totalité des souches de notre collection (Tableau 6). Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 50 µL, contenant 1 U de l'enzyme Taq DNA polymérase (Roche), 5 µL du Tampon PCR 10X (Roche), 200 µM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce sens et anti-sens et 50 ng d'ADN génomique.

Les cycles d'amplification ont été réalisés dans un thermocycleur de type : PTC 200 selon le régime thermique suivant : 94°C – 5 min ; [94°C – 30 sec ; 56, 58, 60, 62, ou 66 °C – 45 sec ; 72°C – 45 sec] x 35 ; 72°C – 5 min.

Les produits d'amplification ont été révélés sur gel d'agarose (1,5%) coloré au bromure d'éthidium.

4. ETUDE DE L'ÉVOLUTION DES POPULATIONS DES SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5 SUR POMMES EN CONSERVATION : TRAÇAGE MIXTE

L'évolution de la population des souches Ach 1-1 et 1113-5 appliquées sur pommes et mises en conservation en chambre froide, a été étudiée en conditions pratiques. Une température de 4°C a fait l'objet de cette étude. Cette étude a été réalisée deux fois dans le temps.

4.1. Réalisation des traitements

Pour chacune des deux souches antagonistes une suspension de deux litres avec une concentration de 10^7 cellules/mL a été préparée. Les suspensions de levures ont été appliquées séparément sur deux lots de 30 pommes Golden Delicious non désinfectées. Par lots de trois, les pommes ont été trempées pendant deux min dans la suspension de levures, puis laissées sécher pendant deux heures à l'air libre. Après application et séchage les deux lots relatifs à chacune des souches de levures ont été placés en chambre froide à 4°C. Un lot de 30 pommes non traitées a été aussi placé en chambre froide pour servir de témoin.

4.2. Récupération et quantification des levures présentes à la surface des pommes

Des échantillons de neuf pommes (3 traitées avec la souche Ach 1-1, 3 traitées avec la souche 1113-5 et 3 non traitées) ont été prélevés avant stockage (deux heures après traitement) ainsi qu'à après 2, 7, 14, 21, 28, 35, 49 et 60 jours de conservation en chambre froide à 4°C. A chaque prélèvement, les pommes ont été lavées individuellement suivant le protocole décrit au paragraphe 2.1. Pour chaque échantillon de trois pommes, cinq mL des eaux de lavage ont été collectées dans un seul tube Falcon de 15 mL, puis diluées deux fois dans le tampon de lavage

KPB par une série de dilution de 1/10. Un volume de 100 μ L de la dilution finale a été par la suite étalé sur le milieu semi-sélectif ainsi que sur milieu PDA et mis en incubation à 25°C pendant quatre jours. Quatre répétitions par objet ont été réalisées.

Le dénombrement des unités formatrices de colonies (ufc) ayant la morphologie des *A. pullulans* a permis l'estimation de la densité de population de levure présente sur la pomme. La densité de la population de levure a été exprimée en termes d'ufc par cm^2 de surface de pomme (ufc/cm^2). La surface d'une pomme a été estimée par une équation, établie à l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), reliant la surface de la pomme et le volume d'eau déplacé par celle-ci (De Clercq et *al.*, 2003).

$$\text{Surface (cm}^2\text{)} = 0,488 \times \text{Volume d'eau déplacé (ml)} + 66,1 ; (r^2 = 0,99)$$

4.3. Identification des colonies par PCR

L'identification d'un nombre représentatif de colonies choisies au hasard, a été faite à l'aide d'amplification PCR. Dix pour cent de colonies par boîtes de Petri ont été individuellement testées pour la présence du marqueur SCAR spécifique à chacune de nos deux souches étudiées. La PCR spécifique a été effectuée après extraction d'ADN d'une colonie selon le protocole décrit au paragraphe 3.1.

Le pourcentage de colonies identifiées comme souche Ach 1-1 ou bien souche 1113-5 a été calculé et le nombre total d'ufc déterminé par cm^2 de surface de pomme a été ajusté.

5. ANALYSES STATISTIQUES DES RÉSULTATS

Les calculs et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les données de la dynamique des populations d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5 à la surface des pommes ont été transformées en Log_{10} avant d'être analysées. Les valeurs moyennes des données de la dynamique des populations des deux souches étudiées ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) puis comparées par utilisation du test de Duncan à l'aide du logiciel SPSS.

Chapitre III :

RÉSULTATS

*« La science, dans ses résultats,
est plus magique que la magie : c'est une magie à preuves ! »*
[Jean-Marie Adiaffi]

1. MISE AU POINT DU MILIEU SEMI-SÉLECTIF

1.1. Résultats du premier criblage des fongicides et antibiotiques

Les matières actives fongicides et antibiotiques ont été testées séparément vis-à-vis de la souche Ach 1-1 à des concentrations comprises entre 0,1 et 100 mg/L. Les résultats du comptage des colonies de la souche Ach 1-1 développées sur les milieux PDA contenant différentes concentrations en fongicides et antibiotiques sont présentés en annexes 4 et 5.

Concrètement, la sélection des antibiotiques et des fongicides a été réalisée sur base de trois critères :

- 1) La non toxicité vis-à-vis de la souche Ach 1-1 : nous avons posé comme hypothèse qu'un milieu contenant une dose donnée en fongicide ou antibiotique était non toxique pour notre souche s'il permettait la survie d'au moins 90% des colonies de la souche Ach 1-1 par rapport aux témoins (nombre de colonies de la souche Ach 1-1 développées sur PDA seul).
- 2) L'efficacité du fongicide sur *B. cinerea* et *P. expansum* : la dose la plus élevée non toxique pour la souche Ach 1-1, devrait permettre d'éliminer les deux pathogènes.
- 3) Le(s) mode(s) d'action(s) et l'appartenance de la famille chimique des matières actives : les agents multi-sites seront privilégiés afin de prévenir l'apparition de souches résistantes des deux pathogènes mais également pour améliorer la sélectivité du milieu et empêcher ainsi la croissance des autres microorganismes isolés à la surface des pommes.

Le tableau 9, présente pour chaque matière active, la dose maximale non toxique pour la souche Ach 1-1 obtenue par nos essais et les DL₅₀ (dose létale à 50%) de ces matières actives vis-à-vis de *B. cinerea* et *Penicillium* sp. déterminées par l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx).

Tableau 9 : Présentation des doses maximales de matières actives non toxiques pour la souche Ach 1-1 et des DL₅₀ des fongicides vis-à-vis de *B. cinerea* et *Penicillium* sp.

Nom commercial	DL ₅₀ (mg/L) vis-à-vis de <i>B. cinerea</i>	DL ₅₀ (mg/L) vis-à-vis de <i>Penicillium</i> sp.	Dose (mg/L) maximale non toxique pour la souche Ach 1-1
Sumico	0,15	0,04	1,5
Lirotect	n.d	n.d	25
Captane	9,9	674	0,5
TMTD	1,4	3,8	1,5
Topsin	548	0,19	1
Pelt 44	n.d	n.d	5
Euparen	0,79	31,9	1
Cycloheximide	n.d	n.d	5
Généticine	n.d	n.d	10
Hygromycine B	n.d	n.d	5
Tétracycline	n.d	n.d	50
Spectinomycine	n.d	n.d	25
Streptomycine sulfate	n.d	n.d	25

n.d : non déterminée

De ce tableau de synthèse, il apparaît que le SUMICO répond parfaitement aux deux premiers critères de sélection. Le TOPSIN semble aussi intéressant mais son utilisation à la concentration de 1 mg/L ne permet pas d'éliminer *B. cinerea*. De plus le SUMICO et le TOPSIN ont le même mode d'action (famille des Benzimidazoles), donc il n'est pas intéressant de les associer. Le TMTD (Dithiocarbamates) et l'EUPAREN (Sulfamides) ont également été sélectionnés pour leur action multi-site même si leurs doses respectives non toxique pour la souche Ach 1-1 reste inférieures aux DL₅₀ déterminées pour *Penicillium* sp. En effet, l'association du TMTD et/ou de l'EUPAREN avec le SUMICO pourrait améliorer la sélectivité du milieu. Pour le LIROTECT (25 mg/L) et le PELT 44 (5 mg/L), ils ont été aussi retenus dans la sélection malgré le manque d'information concernant leurs DL₅₀ à l'égard de *B. cinerea* et *Penicillium* sp.

En ce qui concerne les antibiotiques, ils ont été tous retenus pour leurs concentrations maximales (de 5 à 50 mg/L) non toxique vis-à-vis de la souche Ach 1-1. Toutefois avec une préférence pour l'Hygromycine B qui a un large spectre d'action qui touche la plupart des champignons et des bactéries, ainsi que la Streptomycine sulfate qui est un bactéricide a large spectre d'action.

De ce premier ciblage cinq fongicides (Sumico à 1,5 mg/L ; Euparen à 1 mg/L ; TMTD à 1,5 mg/L ; Lirotect à 25 mg/L et Pelt 44 à 5 mg/L) et six antibiotiques (Cycloheximide à 5 mg/L ; Généticine à 10 mg/L ; Hygromycine B à 5 mg/L ; Tétracycline à 50 mg/L ; Spectinomycine à 25 mg/L ; et Streptomycine sulfate à 25 mg/L) ont été retenus à leur dose maximale non toxique vis-à-vis de la souche Ach 1-1.

1.2. Résultats des combinaisons des fongicides et des antibiotiques

Des combinaisons ternaires, quaternaires et quinquénaires des matières actives retenues ont été réalisées. Dans un premier temps, les combinaisons ont été réalisées avec la dose maximale non toxique de chaque fongicide et antibiotique vis-à-vis de la souche Ach 1-1. À chaque fois que la combinaison testée était toxique vis-à-vis de la souche Ach 1-1, on procédait par diminution de 25 % à 50 % de la concentration d'une ou bien de toutes les matières actives. Ces combinaisons ont été parallèlement testées vis-à-vis de la microflore de l'air en laissant des boîtes de Petri (3 boîtes par combinaison + PDA seul) ouvertes dans l'enceinte du laboratoire pendant environ 3 heures. Toutes les boîtes ont été incubées pendant une semaine à 25°C. Les résultats de différentes combinaisons réalisées et testées vis-à-vis de la souche Ach 1-1 ont été consignés dans l'annexe 6.

De ce tableau (Annexe 6), il ressort que certaines combinaisons se sont avérées non toxiques vis-à-vis de la souche Ach 1-1 (% de viabilité supérieur à 90%). Par contre elles n'avaient pas un effet inhibiteur total sur la microflore de l'air, les milieux étaient de 50 à 100% envahis de champignons filamenteux, de levures et de bactéries. Seule la combinaison S₁₈ a montré une inhibition totale vis-à-vis de la microflore de l'air, en effet aucune colonie ne s'est développée sur ce milieu semi-sélectif laissé ouvert dans l'enceinte du laboratoire durant trois heures (Figure 11D). Le milieu témoin PDA, en présence (Figure 11A) ou en absence (Figure 11B) de la souche Ach 1-1, était complètement envahi par différents types de champignons ainsi que quelques colonies de levures et de bactéries. Le développement de colonies de la souche Ach 1-1 sur milieu PDA seul s'observe après 48 heures d'incubation, alors que sur milieu S₁₈ les colonies n'apparaissent qu'après trois jours d'incubation (Figure 11C).

Toutefois, tenant toujours à donner un spectre d'action plus large à notre milieu semi-sélectif, nous avons tenté dans un autre essai d'incorporer au milieu S₁₈ de la Généticine à 2,5 mg/L, de la Cycloheximide à 1 mg/L ou bien du Lirotect à 25 mg/L. Les résultats obtenus pour ces essais, ont montré que, l'ajout de la Généticine ou du Lirotcet dans la combinaison, rendait le milieu S₁₈ toxique vis-à-vis de la souche Ach 1-1 (0 % de viabilité), par contre l'addition de la Cycloheximide (1 mg/L) au milieu S₁₈ s'est avérée non toxique vis-à-vis de la souche Ach 1-1, le taux de viabilité était de $98,7 \pm 8,7$ (%). Ce milieu a été noté milieu S₃₂ (Euparen 0,5 mg/L + Sumico 1 mg/L + Hygromycine B 2,5 mg/L + Streptomycine sulfate 30 mg/L + Cycloheximide 1 mg/L).

La sélectivité de ce milieu a été évaluée respectivement sur la microflore de l'air et la microflore provenant de la surface des pommes non traitées. Concernant le test de sélectivité du milieu S₃₂ vis-à-vis de la microflore de l'air, aucun autre microorganisme à part la souche Ach 1-1 ne s'est développé sur ce milieu laissé ouvert trois heures dans l'enceinte du laboratoire (Figure 12B). Le test de sélectivité de ce milieu semi-sélectif à l'égard de la microflore isolée à partir de la surface des pommes n'était pas efficace à 100 %, on a observé le développement de rares colonies d'une levure blanche, mais qui étaient morphologiquement très différentes de l'espèce *A. pullulans* (Figure 12C). Le témoin PDA était complètement envahi de différents types de champignons, de levures et de bactéries (Figure 12A).

Sur base des résultats de toxicité et de sélectivité, le milieu S₃₂ semble idéal. En effet, statistiquement il n'est pas différent du milieu PDA (le nombre de colonies développées sur milieu PDA est égale au nombre de colonies développées sur milieu S₃₂), il est très intéressant en terme de spécificité, puisque il a permis une inhibition totale de la microflore de l'air ainsi qu'une inhibition très importante vis-à-vis de la microflore épiphytique des pommes. La toxicité du milieu S₃₂ a été testée de la même façon vis-à-vis de la souche 1113-5, cette dernière a présenté des taux de viabilité proches de 100%. Le milieu semi sélectif S₃₂ a été par la suite utilisé dans un essai de traçage des deux souches Ach 1-1 et 1113-5 après leur application sur pommes et conservation en chambre froide.

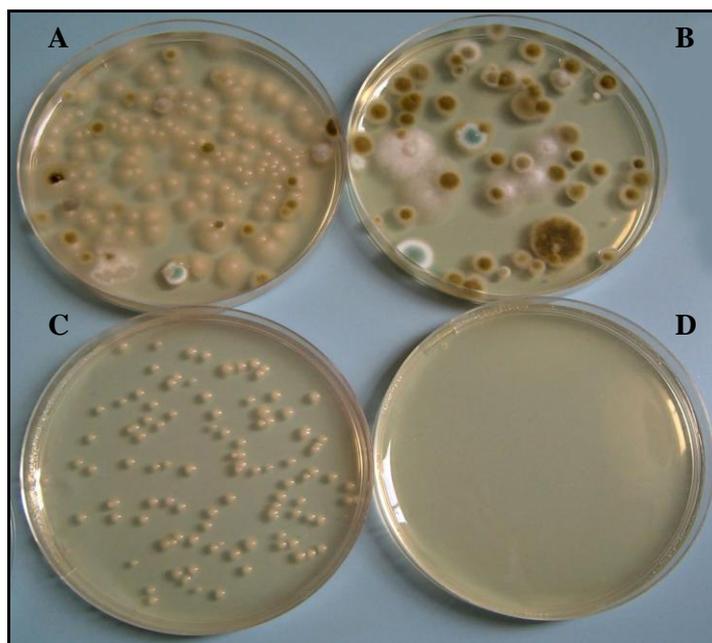


Figure 11 : Test de toxicité et de sélectivité du milieu semi-sélectif S_{18} (C et D) par comparaison au milieu PDA (A et B). Les milieux (A et C) ont été ensemencés avec 100 μL d'une suspension de la souche Ach 1-1 à 10^3 ufc/mL. Toutes les boîtes de Petri ont été laissées ouvertes pendant trois heures sur la paillasse du laboratoire puis incubées à 25°C durant une semaine.

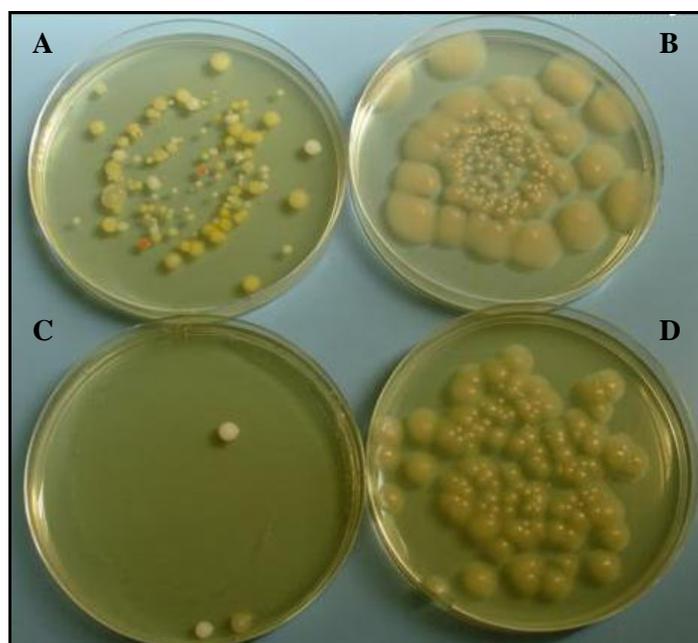


Figure 12 : Test de toxicité et de sélectivité du milieu semi-sélectif S_{32} (B, C et D) par comparaison au milieu PDA (A). Les milieux (A et C) ont été ensemencés avec 100 μL d'une suspension préparée à partir des eaux de lavage de pommes. Les milieux (B et D) ont été ensemencés avec une suspension de la souche Ach 1-1 (100 μL à 10^3 ufc/mL) puis laissés ouverts (B) ou non (D) sur la paillasse du laboratoire pendant trois heures. Toutes les boîtes ont été incubées à 25°C pendant une semaine.

2. EXTRACTION DE L'ADN

Une ou plusieurs extractions d'ADN ont été effectuées sur toutes les souches de notre collection selon la méthode d'Ausubel et *al.* (1987) avec des modifications mineurs. Pour chaque échantillon, la concentration de l'ADN a été déterminée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm. Le rapport A260 nm / A280 nm, renseignant sur la contamination des acides nucléiques par les protéines, était en général compris entre 1,8 et 2, ce qui confirme la pureté de notre ADN extrait.

La vérification de la qualité de l'ADN extrait a été également réalisée par migration sur gel d'agarose à 0,8%. La visualisation sous UV d'une seule bande d'ADN à un niveau haut du gel fourni une indication de la bonne qualité de l'ADN (ADN non dégradé).

3. SÉLECTION DE MARQUEURS RAPD

3.1. Marqueurs RAPD relatifs à la souche Ach 1-1

Dans le but de chercher un marqueur moléculaire spécifique à la souche Ach 1-1, 39 amorces décimères choisies au hasard ont été testées. Dans un premier temps, les amorces choisies ont été testées sur les extraits d'ADN de la souche Ach 1-1 et deux autres souches Ach 2-1 et Ach 2-2, considérées comme souches de référence. Seules les amorces capables de générer au moins un produit d'amplification spécifique à la souche étudiée ont été retenues. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, les amorces RAPD retenues ont été réévaluées sur trois préparations d'ADN différentes.

Parmi les 39 amorces, seulement huit amorces (OPP-01, OPQ-04, OPQ-12, OPR-06, OPR-13, OPT-01, OPT-05, OPT-17) ont fourni au moins un fragment RAPD spécifiquement présent chez la souche Ach 1-1, et absent chez les deux autres souches de référence (Figures 13 et 14). La taille des bandes spécifiques était comprise entre 500 et 2600 pb. Le tableau 10 résume les résultats trouvés avec les différentes amorces présélectionnées pour leur attitude à générer au moins un produit d'amplification spécifique à la souche Ach 1-1.

Les autres amorces (31 amorces) ont été exclues de la sélection pour au moins une de ces raisons : (1) Absence total de fragments d'ADN amplifiés pour les trois souches évaluées (la souche Ach 1-1 incluse), (2) amplification non reproductible des bandes spécifiques pour la souche Ach 1-1 et (3) présence de fragments d'ADN amplifiés mais non spécifique à la souche Ach 1-1.

Tableau 10 : Taille et nombre des bandes spécifiques à la souche Ach 1-1 obtenues par les huit amorces pré-sélectionnées

Amorces	Séquences (5' - 3')	Nombre de bandes spécifiques	Taille des bandes spécifiques (pb)
OPP-01	GTAGCACTCC	4	700, 780, 910, 980
OPQ-04	AGTGCGCTGA	1	1060
OPQ-12	AGTAGGGCAC	2	620, 875
OPR-06	GTCTACGGCA	2	500, 1100
OPR-13	GGACGACAAG	1	525
OPT-01	GGCCACTCA	4	525, 570, 2100, 2600
OPT-05	GGGTTTGGCA	1	825
OPT-17	CCAACGTCGT	3	1080, 1300, 2200

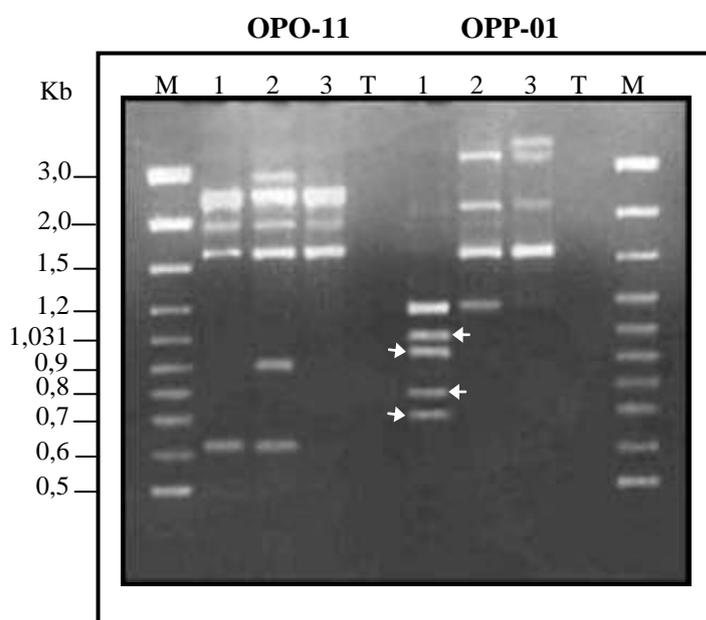


Figure 13 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPO-11 et OPP-01.

Les pistes numérotées 1 correspondent à la souche Ach 1-1 d'*Aureobasidium pullulans*, les pistes 2 et 3 correspondent respectivement aux souches Ach 2-1 et Ach 2-2. M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas). T : Témoin négatif. Les flèches indiquent la position des fragments spécifiques relatifs à la souche Ach 1-1.

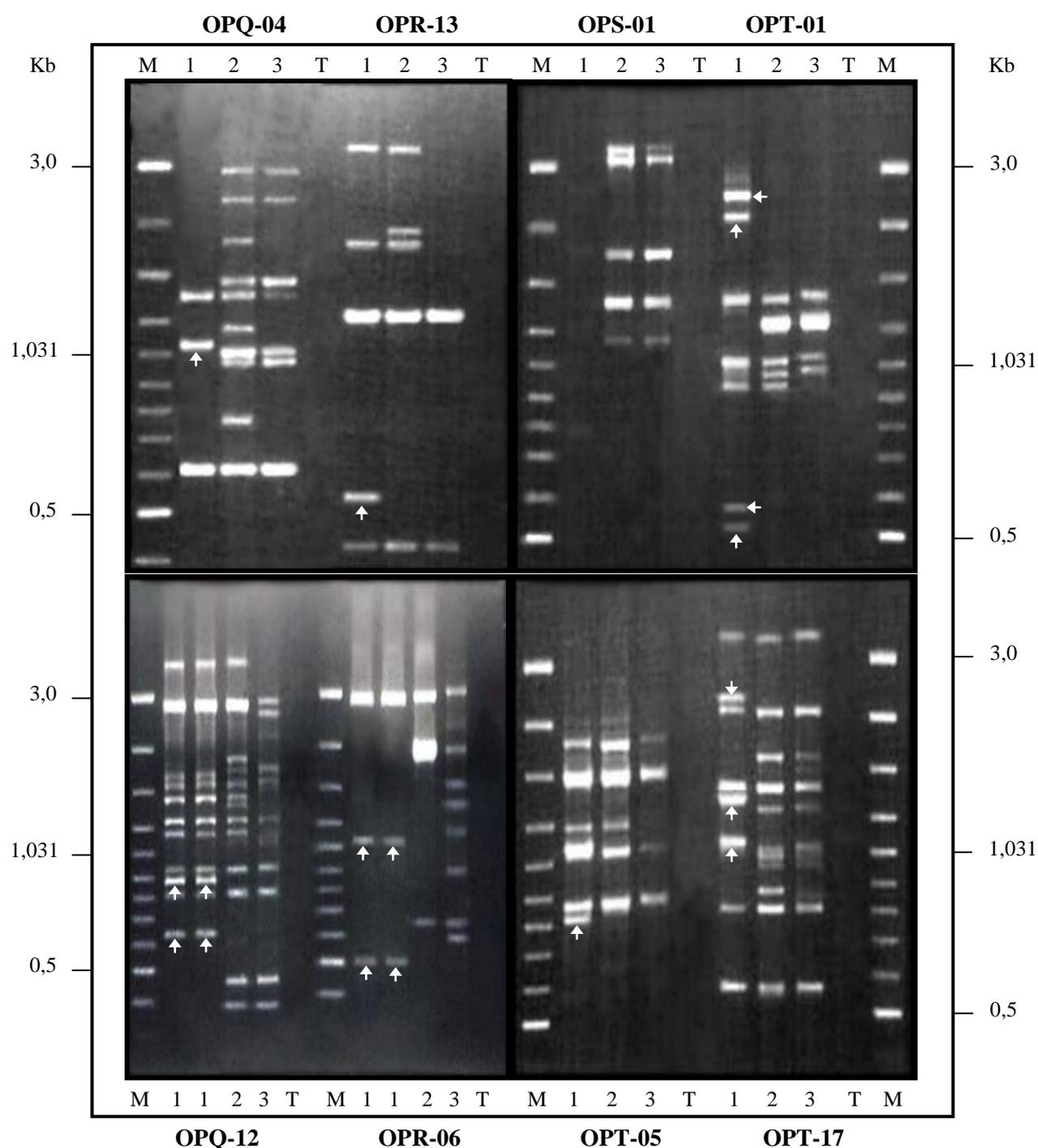


Figure 14 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPQ-04, OPR-13, OPS-01, OPT-01, OPQ-12, OPR-06, OPT-05 et OPT-17.

Les pistes numérotées 1 correspondent à la souche Ach 1-1 d'*Aureobasidium pullulans*, les pistes 2 et 3 correspondent respectivement aux souches Ach 2-1 et Ach 2-2. M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas). T : Témoin négatif. Les flèches indiquent la position des fragments spécifiques relatifs à la souche Ach 1-1.

Après cette première étape de sélection, les huit amorces retenues ont été ensuite évaluées sur la totalité des souches d'*Aureobasidium pullulans* de notre collection, excepté les souches 1113-5, 1113-10 et 1206-5. Cinq de ces huit amorces présélectionnées ont été retenues puisque chacune d'elles a permis d'identifier une bande reproductible et spécifique à la souche Ach 1-1, il s'agit des amorces : OPQ-04, OPQ-12, OPR-13, OPT-01 et OPT-17 (Tableau 11 et Figures 15 et 16).

Tableau 11 : Taille et nombre des bandes spécifiques à la souche Ach 1-1 obtenues par les cinq amorces retenues

Amorces	Séquences (5' - 3')	Nombre de bandes spécifiques	Taille des bandes spécifiques (pb)
OPQ-04	AGTGCGCTGA	1	1060
OPQ-12	AGTAGGGCAC	1	875
OPR-13	GGACGACAAG	1	525
OPT-01	GGGCCACTCA	1	525
OPT-17	CCAACGTCGT	1	1300

L'amorce OPQ-04 a généré un fragment de 1060 pb spécifique à la souche Ach 1-1, se fragment a demeuré spécifique lors de la deuxième sélection puisqu'il est absent chez la totalité des autres souches d'*Aureobasidium pullulans* testées (Figure 15A).

L'amorce OPQ-12 a généré lors de la présélection deux bandes spécifiques à la souche Ach 1-1, une bande de 620 pb de faible intensité, et une bande de 875 pb de forte intensité. Pendant la deuxième sélection, seule la bande de 875 pb s'est avérée spécifique à la souche Ach 1-1, par contre la bande de 620 pb a été retrouvée chez la souche MUCL 19714 (Figure 15B, piste 10), et chez la souche MUCL 6147 (Figure 15B, piste 5) avec une très faible intensité.

L'amorce OPR-13 a fourni lors de la première sélection un produit d'amplification d'environ 525 pb spécifique à la souche Ach 1-1, suite à la seconde sélection ce produit a permis de caractériser de façon spécifique et reproductible la souche Ach 1-1 par rapport aux autres souches d'*A. pullulans* testées (Figure 15C).

Pour l'amorce OPT-01 seul le fragment de 525 pb est resté spécifique à la souche Ach 1-1, par contre les autres bandes ont perdu leur spécificité. La bande de 570 pb est présente avec une faible intensité chez la souche MUCL 20322 (Figure 16A, piste 05), la bande de 2100 pb est présente avec une faible intensité chez les souches MUCL 22377 (Figure 16A, piste 3), MUCL

20326 (Figure 16A, piste 4) et MUCL 20322 (Figure 16A, piste 5). Concernant la bande de 2600 pb elle est présente également chez la souche MUCL 22377 (Figure 16A, piste 3) avec une faible intensité, par contre elle est présente chez la souche MUCL 20326 (Figure 16A, piste 4) avec une forte intensité.

Pour l'amorce OPT-17 seul le produit d'amplification de 1300 pb est caractéristique à la souche Ach 1-1. La bande de 1080 pb s'est avérée aussi présente avec une forte intensité chez les souches MUCL 22377 (Figure 16B, piste 3), MUCL 20326 (Figure 16B, piste 4), MUCL 20322 (Figure 16B, piste 5) et avec une faible intensité chez la souche MUCL 8724 (Figure 16B, piste 9) ainsi que chez la souche MUCL 19714 (Figure 16B, piste 11). Pour la bande de 2200 pb elle est présente avec une intensité moyenne chez la souche MUCL 7862 (Figure 16B, piste 10).

Les amorces OPP-01, OPR-06 et OPT-05 ont été exclues suite à cette deuxième sélection puisque les bandes qui étaient spécifiques à la souche Ach 1-1 lors de la pré-sélection ont été retrouvées chez les autres souches MUCL d'*Aureobasidium pullulans*.

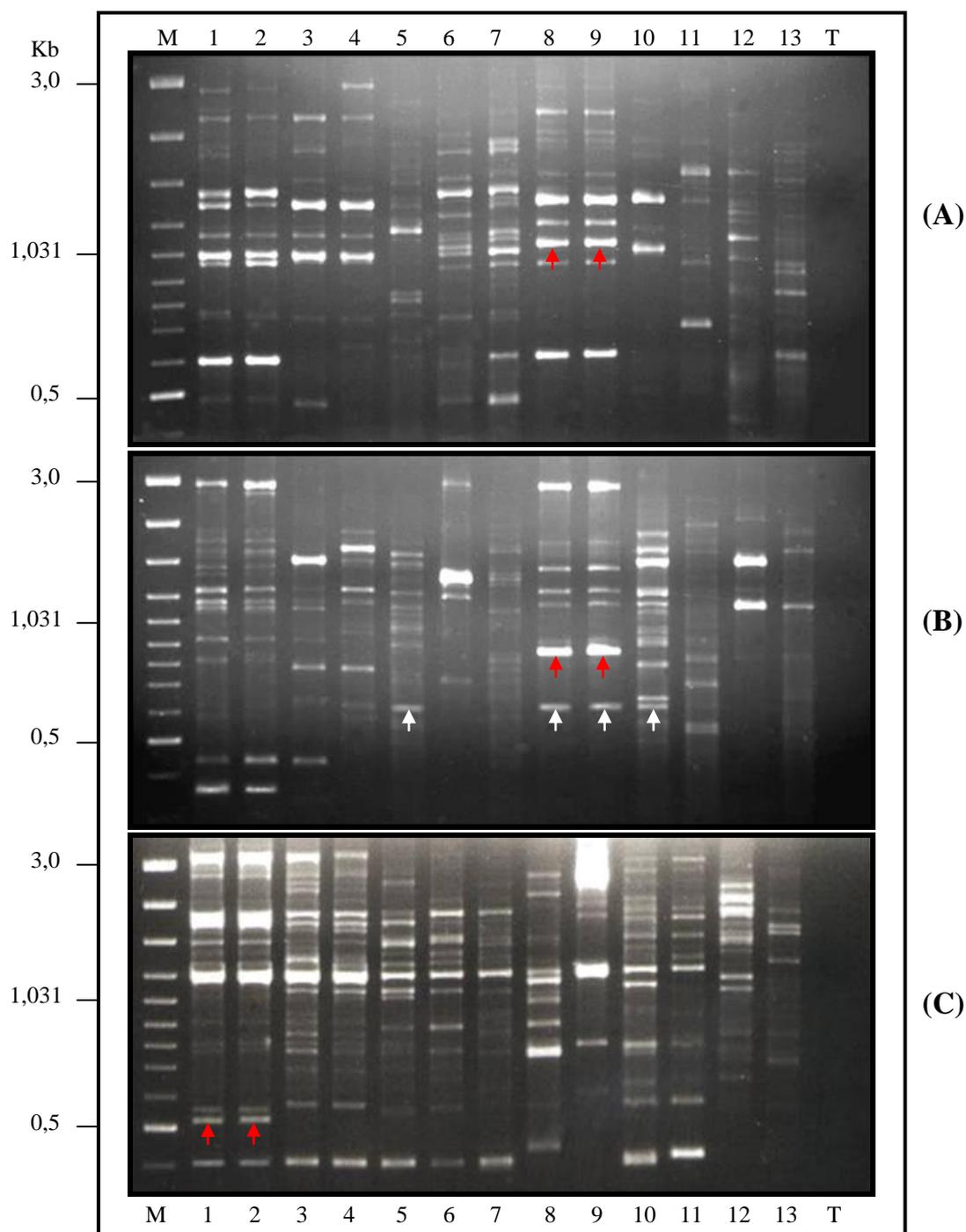


Figure 15 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPQ-04 (A), OPQ-12 (B) et OPR-13 (C) sur l'ADN génomique des 12 souches d'*Aureobasidium pullulans* testées. Les flèches rouges indiquent la position des fragments spécifiques à la souche Ach 1-1. Les flèches blanches indiquent la position des fragments qui ont perdu leur spécificité lors de la seconde sélection.

(A) et (B) : Ach 2-1 (1) ; Ach 2-2 (2) ; MUCL 22377 (3) ; MUCL 20326 (4) ; MUCL 6147 (5) ; MUCL 20322 (6) ; MUCL 7862 (7) ; Ach 1-1 (8 et 9) ; MUCL 19714 (10) ; MUCL 8724 (11) ; MUCL 19360 (12) ; MUCL 43163 (13) ; M: Marqueur de taille : Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T = Témoin sans ADN.

(C) : Ach 1-1 (1 et 2) ; Ach 2-1 (3) ; Ach 2-2 (4) ; MUCL 22377 (5) ; MUCL 20326 (6) ; MUCL 20322 (7) ; MUCL 6147 (8) ; MUCL 8724 (9) ; MUCL 7862 (10) ; MUCL 19714 (11) ; MUCL 19360 (12) ; MUCL 43163 (13) ; M: Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T = Témoin sans ADN.

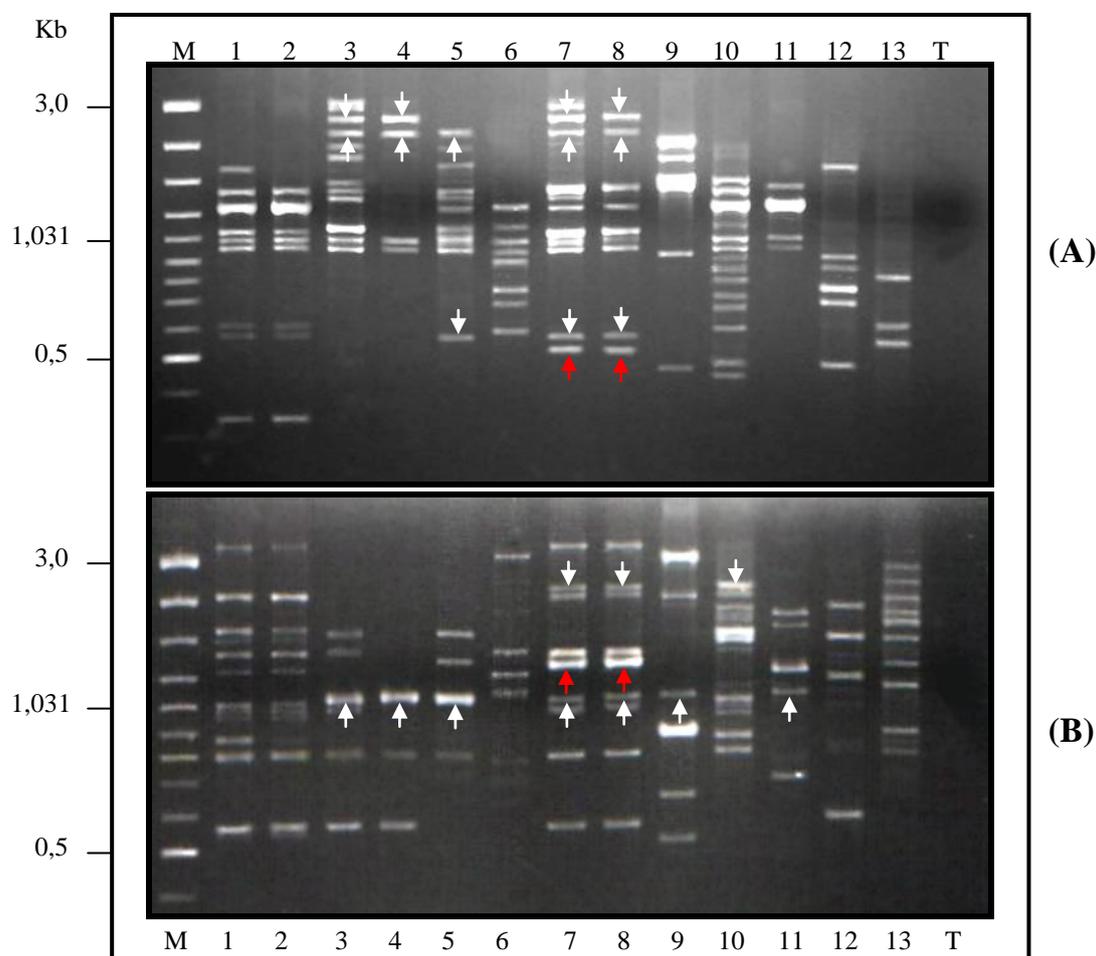


Figure 16 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPT-01 (A), OPT-17 (B) sur l'ADN génomique des 12 souches d'*Aureobasidium pullulans* testées. Les flèches rouges indiquent la position des fragments spécifiques relatifs à la souche Ach 1-1. Les flèches blanches indiquent la position des fragments qui ont perdu leur spécificité lors de la seconde sélection.

(A) et (B) : Ach 2-1 (1) ; Ach 2-2 (2) ; MUCL 22377 (3) ; MUCL 20326 (4) ; MUCL 20322 (5) ; MUCL 6147 (6) ; Ach 1-1 (7 et 8) ; MUCL 8724 (9) ; MUCL 7862 (10) ; MUCL 19714 (11) ; MUCL 19360 (12) ; MUCL 43163(13) ; M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T = Témoin sans ADN.

3.2. Marqueurs RAPD relatifs à la souche 1113-5

Parmi les 60 amorces testées, 16 amorces ont fourni au moins un fragment RAPD spécifique à la souche 1113-5, mais absent chez les deux autres souches de référence Ach 1-1 et 1113-10 (Tableau 12). La taille des bandes spécifiques était comprise entre 400 et 1400 pb. Des exemples de gels de migration des produits RAPD montrant des bandes spécifiques à la souche 1113-5 sont présentés dans la Figure 17.

Tableau 12 : Représentation des amorces pré-sélectionnées et des bandes spécifiquement amplifiées vis-à-vis de la souche 1113-5

Amorces	Séquences (5' - 3')	Nombre de bandes spécifiques	Taille des bandes spécifiques (pb)
OPM-09	GTCTTGCGGA	2	700, 1400
OPN-17	CATTGGGGAG	1	460
OPO-05	CCCAGTCACT	1	500
OPP-04	GTGTCTCAGG	1	980
OPP-09	GTGGTCCGCA	1	920
OPP-14	CCAGCCGAAC	1	750
OPQ-03	GGTCACCTCA	1	430
OPR-06	GTCTACGGCA	1	500
OPR-07	ACTGGCCTGA	1	1100
OPR-20	ACGGCAAGGA	1	980
OPS-01	CTACTGCGCT	1	680
OPS-07	TCCGATGCTG	1	800
OPS-11	AGTCGGGTGG	1	500
OPT-02	GGAGAGACTC	2	400, 1031
OPT-05	GGGTTTGGCA	1	550
OPT-06	CAAGGGCAGA	1	520

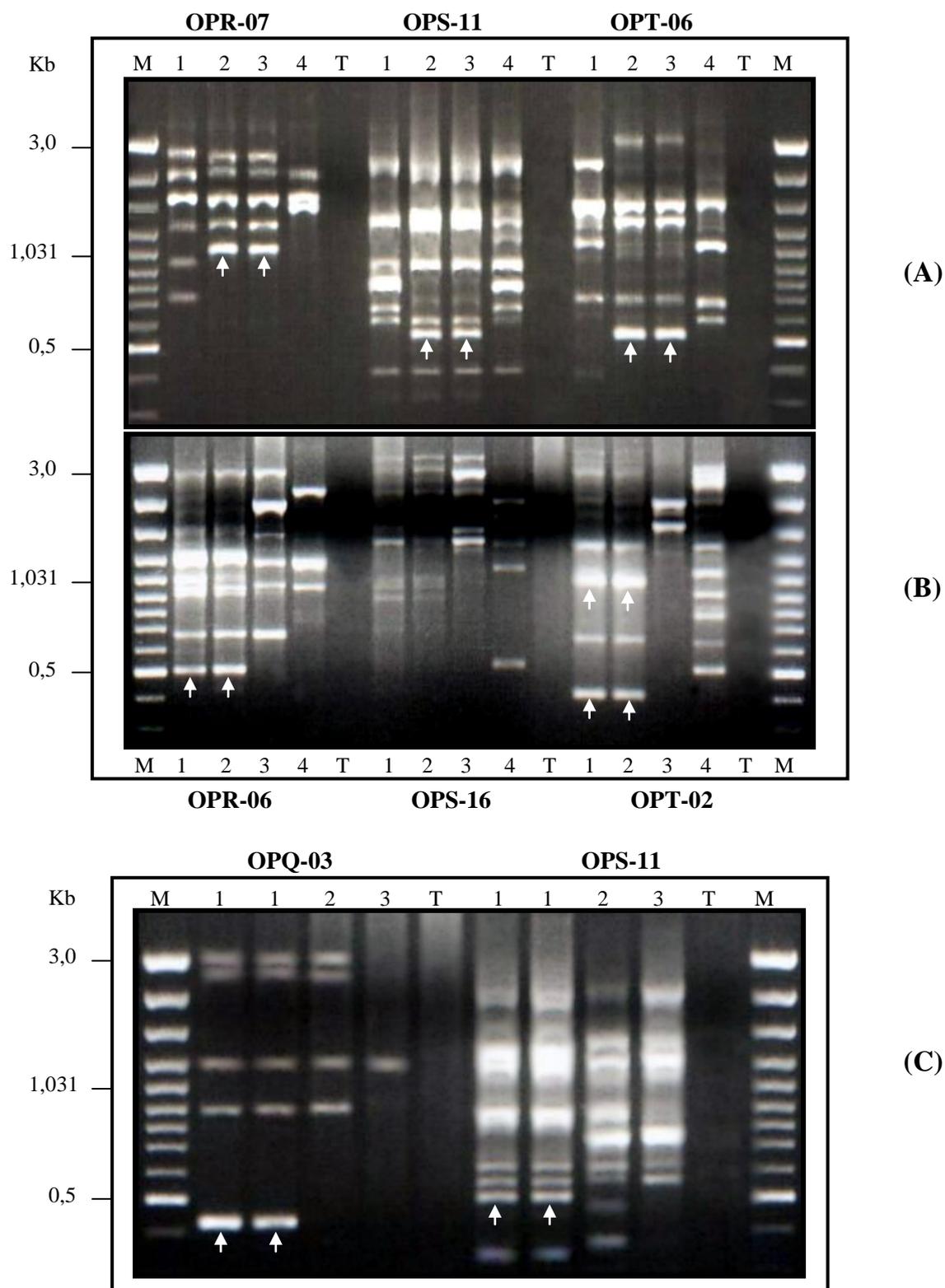


Figure 17 : Profils RAPD obtenus avec les amorces, OPR-07, OPS-11, OPT-06, OPR-06, OPS-16, OPT-02, OPQ-03 et OPS-11. Les flèches indiquent la position des fragments spécifiques à la souche 1113-5.

(A) : La piste numérotée 1 correspond à la souche Ach 1-1 d'*Aureobasidium pullulans* ; les pistes 2 et 3 correspondent à la souche 1113-5 ; la piste 4 correspond à la souche 1113-10 ; M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin négatif.

(B) et (C) : Les pistes numérotées 1 et 2 correspondent à la souche 1113-5 d'*Aureobasidium pullulans* ; la piste 3 correspond à la souche 1113-10 ; la piste 4 correspond à la souche Ach 1-1 ; M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin négatif.

Après cette première étape de sélection, seulement huit de ces amorces retenues ont été évaluées sur la totalité de la collection des souches d'*Aureobasidium pullulans*. Il s'agit des amorces OPN-17, OPO-05, OPP-14, OPQ-03, OPR-06, OPR-20, OPT-02 et OPT-06. Trois de ces huit amorces pré-sélectionnées ont généré chacun et de façon reproductible une bande spécifique à la souche étudiée (souche 1113-5). Il s'agit des amorces OPN-17, OPO-05 et OPQ-03 (Tableau 13, Figure 18).

Tableau 13 : Représentation des résultats d'amplification par les trois amorces retenues pour la souche 1113-5

Amorces	Séquences (5' - 3')	Nombre de bandes spécifiques	Taille des bandes spécifiques (pb)
OPN-17	CATTGGGGAG	1	460
OPO-05	CCCAGTCACT	1	500
OPQ-03	GGTCACCTCA	1	430

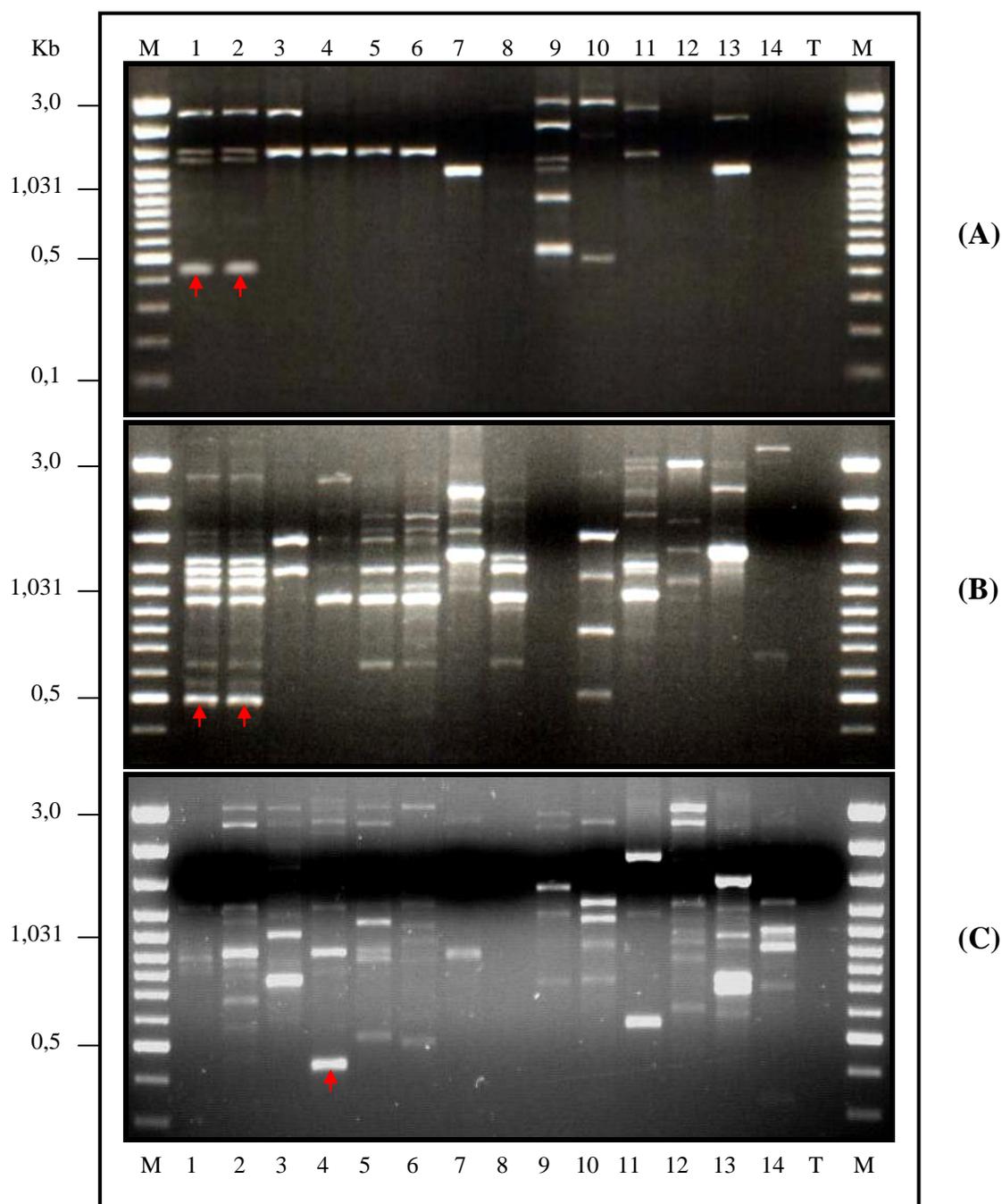


Figure 18 : Profils RAPD obtenus avec les amorces OPN-17 (A), OPO-05 (B) et OPQ-03 (C) sur l'ADN génomique des souches d'*Aureobasidium pullulans* testées. Les flèches indiquent la position des fragments spécifiques à la souche 1113-5.

(A) et (B) : 1113-5 (1et 2) ; 1113-10 (3) ; Ach 1-1 (4) ; Ach 2-1 (5) ; Ach 2-2 (6) ; MUCL 22377 (7) ; MUCL 20326 (8) ; MUCL 6147 (9) ; MUCL 8724 (10) ; MUCL 7862 (11) ; MUCL 19714 (12) ; MUCL 19360 (13) ; MUCL 43163 (14) ; M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin sans ADN.

(C) : Ach 1-1 (1) ; Ach 2-1 (2) ; Ach 2-2 (3) ; 1113-5 (4) ; 1113-10 (5) ; 1206-5 (6) ; MUCL 19360 (7) ; MUCL 19714 (8) ; MUCL 43163 (9) ; MUCL 7862 (10) ; MUCL 8724 (11) ; MUCL 20326 (12) ; MUCL 6147 (13) ; MUCL 22377 (14) ; M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin sans ADN.

4. CONVERSION DE MARQUEURS RAPD EN MARQUEURS SCAR

4.1. Purification et Clonage des marqueurs RAPD

Le fragment RAPD d'environ 525 pb spécifique à la souche Ach 1-1 obtenu avec l'amorce OPR-13 (Figure 15C) et la bande d'environ 430 pb spécifique à la souche 1113-5 amplifiée avec l'amorce OPQ-03 (Figure 18C) ont été excisés du gel d'agarose puis purifiés (cf. matériel et méthodes). La réussite de ces deux opérations a été vérifiée par la mise en migration sur gel d'agarose (1,5%) des deux bandes extraites (Figure 19). Cette opération nous a permis également d'estimer la quantité de l'ADN extrait du gel par comparaison de son intensité avec celle des bandes marqueurs. La quantité du produit obtenu a été évaluée à environ 6 ng/ μ L.

Chacune des deux bandes a été ensuite introduite dans le plasmide pCR[®] 2.1. Après transformation bactérienne, quatre clones recombinants (colonies blanches) respectivement relatifs à la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 ont été choisis et leur ADN plasmidique a été extrait.

Avant de procéder au séquençage des plasmides recombinants, une étape de vérification de la taille de l'insert s'impose. Cette vérification a été réalisée par amplification PCR de l'ADN plasmidique recombinant à l'aide du couple d'amorce T7 et M13 Reverse. La taille du produit d'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose (1,5 %). La figure 20 montre un exemple de profile obtenu après amplification PCR des plasmides recombinants relatifs à la souche Ach 1-1. Pour les quatre clones testés, la taille des fragments d'ADN amplifiés est d'environ 700 pb, c'est-à-dire 525 pb la taille de l'insert plus 175 pb qui correspondent à la somme de la distance qui sépare l'emplacement des deux amorces T7 et M13 Reverse de l'endroit d'insertion de la bande clonée (cf. carte du plasmide pCR[®] 2.1, Annexe 3). De la même façon, les clones recombinants relatifs à la souche 1113-5 ont montré des inserts avec une taille égale à celle déjà estimée sur gel RAPD, c'est-à-dire un fragment de 430 pb.

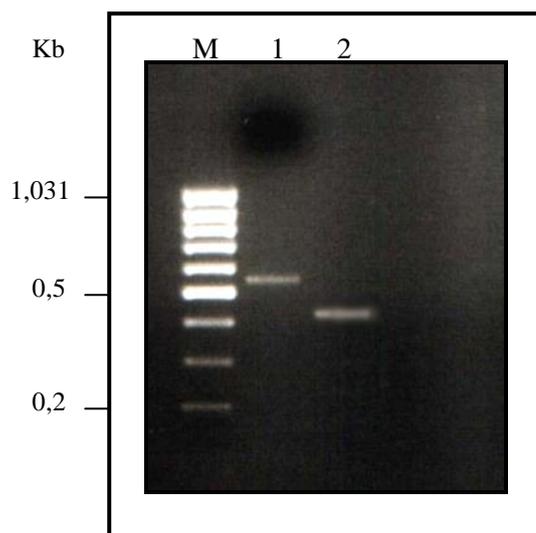


Figure 19 : Un exemple d'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium du résultat d'extraction et de purification de la bande de 525 pb générée avec l'amorce OPR-13 (piste 1) et de la bande de 430 pb amplifiée avec l'amorce OPQ-03 (piste 2) respectivement spécifiques à la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5. M : Marqueur de poids moléculaire (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas).

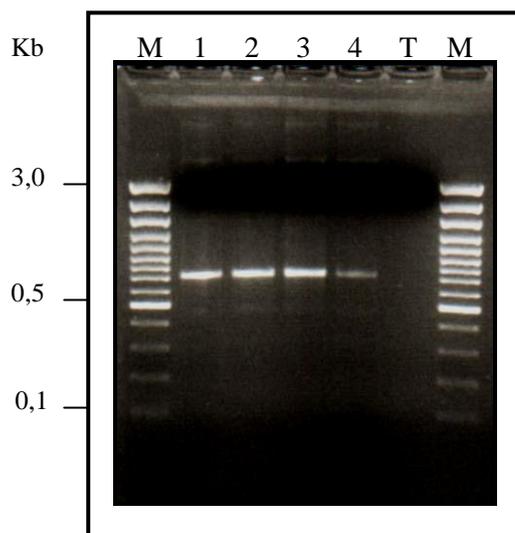


Figure 20 : Un exemple d'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits d'amplification PCR réalisée avec les amorces T7 et M13 Reverse sur des miniprep de plasmides recombinants ayant insérés la bande de 525 pb spécifique à la souche Ach 1-1. Les pistes numérotées 1, 2, 3 et 4 correspondent aux 4 clones recombinants. T : Témoin négatif ; M : Marqueur de poids moléculaire Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

4.2. Séquençage et conception d'amorces SCAR

Pour chacune de nos deux souches étudiées, deux clones contenant les inserts appropriés ont été par la suite séquencés. Chaque clone choisi a été respectivement séquencé avec l'amorce T7 puis avec l'amorce M13 Reverse. Les séquences obtenues ont été ensuite traitées avec le logiciel DNAMAN pour identifier la séquence de l'insert. Les deux séquences consensus relatifs à la bande de 525 pb et la bande de 430 pb, amplifiées respectivement avec l'amorce OPR-13 et OPQ-03, ont été déterminées par alignement des deux séquences obtenues par l'amorce T7 et l'amorce M13 Reverse respectivement grâce au logiciel **ClustalW**.

Les séquences des marqueurs RAPD spécifiques à la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 respectivement obtenues avec les amorces OPR-13 et OPQ-03 sont représentées sur la figure 21. La séquence de la bande spécifique à la souche Ach 1-1 est composée de 528 pb, par contre la séquence de la bande spécifique à la souche 1113-5 est composée de 431 pb. Les dix premiers nucléotides de chaque extrémité des deux marqueurs RAPD, correspondant à la séquence de chacune des deux amorces OPR-13 (5'-CGACGACAAG-3') et OPQ-03 (5'-GGTCACCTCA-3') utilisées lors de l'amplification RAPD ont été retrouvés.

Les séquences de ces deux marqueurs RAPD, par utilisation du logiciel MegaBlast du NCBI, n'ont présenté aucune similarité significative avec les séquences d'ADN déposées jusqu'à présent dans les banques de séquences internationales (GenBank, EMBL, DDBJ et PDB).

Ces deux séquences spécifiques aux souches Ach 1-1 et 1113-5 ont été déposées sur la banque de séquences internationale GenBank respectivement avec les numéros d'accessions suivants : **JQ083078** et **JQ083079**.

Sur base des deux séquences RAPD trouvées, six amorces ont été définies pour la souche Ach 1-1 et huit amorces pour la souche 1113-5. Les amorces SCAR AR13.1 et AR13.2, relatifs à la souche Ach 1-1, ont été conçus par élongation de l'amorce OPR-13 au niveau des extrémités droite et gauche de la séquence du marqueur RAPD. De la même façon les amorces SCAR AQ3.1 et AQ3.2, relatifs à la souche 1113-5, ont été issues du prolongement de la séquence de l'amorce OPQ-03. Les autres amorces ont été choisies à partir des amorces fournies par le logiciel **Primer3**. Les amorces ont été définies de manière à ce que leurs températures de fusion (T_m ou Melting temperature) soit très proches (n'excédant pas 2 à 3°C) tout en évitant des

amorces qui font des auto-appariements (l'extrémité 3' doit être libre) ou des appariements entre eux (des appariements partiels sont acceptés). Le tableau 14 donne les séquences de ces amorces, leurs positions de fixation ainsi que leurs T_m.

SEQ Marqueur Ach 1-1 : 528 bp (Numéro d'accension : JQ083078)

Composition: 155 A; 152 C; 115 G; 106 T; 0 OTHER

Percentage: 29.4% A; 28.8% C; 21.8% G; 20.1% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 162.50 dsDNA: 325.51

```

1      CGACGACAAG AAAACTGGAT CATGTCAAGG TCGGACCATT TTTGTTTTCA GAAGTCAGAG
61     GACCAGTCAA CTACAAACTC CAACTCCCTG ACGATGCGAA AATCCACCCG GTATTCCACT
121    TCCACATATC ACTCCTTGAA CCAGCAGACC CAGAAACACC GTTGCAGACG ACATTCCATT
181    TCCAGACAGA AGAAAACGAC GAATTCTGAAG TCGAAGAAAT ACTGGAACAA CGAGGTCAGC
241    GATACCTTGT AAAATGGAAA GGTTACCCAC CTTCAGACAA TACATGGGAA CCACGAGGAA
301    ATCTTAAGAA CTGCCAGACC CTCCTGCGAC GGTTCACCA CGCAGCGAGA AGTCAACGGC
361    GTTGTTCATA AAATCCATCG CGGACCAGAC AGCAGGAGAC AAGCCGACAG TCGCGTCAGC
421    CGCAGGACAG TCCTCGTTGT CGTCTTCGAC ATCGAGCTCC CCCGCTGCTG ACAAGTCGTG
481    TTGTATGTGC GACATTCGCA TCTTGTTCCG CTCCTCAGCT TGACGTCC

```

(A)**SEQ Marqueur 1113-5 : 431 bp (Numéro d'accension : JQ083079)**

Composition : 136 A; 88 C; 105 G; 102 T; 0 OTHER

Percentage : 31.6% A; 20.4% C; 24.4% G; 23.7% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 133.55 dsDNA: 265.69

```

1      GTCACCTCAA GAAATATATT GTCTTCATCT GTGCTTGTGA ATCTGCTTTC AACAACTATA
61     CCGCTTTCCG ACATAGCTCC AAGTTGTATG TCACTGCCAA ATATACGTCT ATATATCCGG
121    ACAGTACACG CACCTGAACC GTGATCAGTA GAAGTCTTGA TTATCGGAGG CTGGTCGCAT
181    GAGGTAGAGA CCGTTGTGGG CTTTAGAGAG GAAGAGGGGT TTGCGAGTAA TAAGTAAGGG
241    ACCATAAAGT CGAGGCCTTT CACACAATAA CCTACCATTC GAAACTCAAG CTCGGAACCA
301    TTGGACAAGT TGGAAGGGAT TCGAGCAAAA CGCGATTACG ATCTCAAATG GCAGGACTGC
361    GCTGGGAAGG GCAGAAAGAA AAACCTTGCA TGAAAAATAT AGGAAGTAAC CACTGATATA
421    ATGAGGTGAC C

```

(B)

Figure 21 : Séquences des marqueurs RAPD générés par utilisation des amorces OPR-13 et OPQ-03 chez *A. pullulans* souche Ach 1-1 **(A)** et *A. pullulans* souche 1113-5 **(B)** respectivement.

Tableau 14 : Description des amorces SCAR conçues pour la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5

Souche ^a	code	Séquences (5' - 3')	Taille (b)	%(GC)	Tm ^b (°C)	Position ^c
Ach 1-1	AR13.1	GACGACAAGAAAACCTGGATCATGT	24	42	62	2 - 25
	AR13.2	GGACGACAAGCTGAGGAGCG	20	65	65	509 - 528
	AR13.3	ACTCCAACCTCCCTGACGATG	20	55	60	77 - 96
	AR13.4	GGTATCGCTGACCTCGTTGT	20	55	60	227 - 246
	AR13.5	CAGAAGTCAGAGGACCAGTCA	21	52	61	49 - 69
	AR13.6	TCGGACATACAACACGACTTG	21	48	60	472 - 492
1113-5	AQ3.1	GTCACCTCAAGAAATATATTGTC	23	35	58	1 - 23
	AQ3.2	GGTCACCTCATTATATCAGTGG	22	45	60	410 - 431
	AQ3.3	AGAGACCGTTGTGGGCTTTAG	21	52	61	186 - 206
	AQ3.4	AGTCCTGCCATTTGAGATCG	20	50	58	339 - 358
	AQ3.5	ATTATCGGAGGCTGGTCGCA	20	55	60	160 - 179
	AQ3.6	CGAATCCCTTCCAACCTGTCC	21	52	61	303 - 323
	AQ3.7	CGAGGCCTTTCACACAATAACC	22	50	62	251 - 272
	AQ3.8	CCTCATGCGACCAGCCTCCG	20	70	67	165 - 184

^a Souche cible

^b Température de fusion déterminée avec la méthode tenant compte de la longueur et les sels monovalents par utilisation du logiciel Oligo Calculator version 3.25.

^c Position dans la séquence des deux marqueurs RAPD obtenus pour la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 par utilisation des amorces RAPD OPR-13 et OPQ-03 respectivement.

4.3. Vérification de la spécificité des couples d'amorces SCAR

4.3.1. Sélection d'amorces SCAR relatifs à la souche Ach 1-1

Afin d'évaluer la spécificité des couples d'amorces choisies, une amplification PCR, dont les conditions sont décrites dans le paragraphe 3.5.6 (matériel et méthodes), a été réalisée sur l'ADN génomique des 14 souches d'*Aureobasidium pullulans*. Pour le choix de la température d'hybridation de la réaction PCR, une température inférieure de 2 à 4°C au Tm du couple d'amorce choisie a été définie. Dans le cas où le Tm est différent pour les 2 amorces, le Tm le plus bas a été considéré comme point de référence. En présence d'amplifications non spécifiques la température d'hybridation a été augmentée par paliers de 2°C. Les couples d'amorces SCAR testés vis-à-vis de la souche Ach 1-1 ainsi que la taille des amplicons attendus ont été représentés sur le tableau 15.

Tableau 15 : Position des amorces SCAR et taille des amplicons attendus chez la souche Ach 1-1

Couple d'amorce	Code	Position ^a	Taille du produit (pb)
1	AR13.1	2-25	527
	AR13.2	509-528	
2	AR13.3	77-96	170
	AR13.4	227-246	
3	AR13.5	49-69	444
	AR13.6	472-492	
4	AR13.1	2-25	245
	AR13.4	227-246	
5	AR13.3	77-96	452
	AR13.2	509-528	
6	AR13.5	49-69	480
	AR13.2	509-528	
7	AR13.3	77-96	416
	AR13.6	472-492	
8	AR13.5	49-69	198
	AR13.4	227-246	

^a Position dans la séquence du marqueur RAPD spécifique à la souche Ach 1-1 généré par utilisation de l'amorce OPR-13.

Les figures 22, 23 et 24 représentent les résultats d'amplification après migration sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium et visualisation sous UV.

L'emploi du couple d'amorces AR13.1/AR13.2, avec une température d'hybridation de 58 °C, a montré en plus de la bande de 527 pb attendue sur le profil de la souche Ach 1-1, une bande de même taille et de forte intensité chez la souche MUCL 20326 (8) et une autre bande de forte intensité de 350 pb chez la souche MUCL 6147(9) ainsi que plusieurs bandes de différentes tailles et de faible intensité présentes dans le profile des autres souches testées à l'exception des souches 1113-10 (6) et MUCL 22377 (7) (Figure 22A).

Afin d'éliminer les bandes parasites et augmenter la spécificité de ce couple d'amorces, la température d'hybridation des amorces a été augmentée de 2°C. Le fragment de 527 pb spécifique à la souche Ach 1-1 a été obtenu. La bande d'environ 527 pb a été aussi amplifiée chez la souche MUCL 20326 (8), mais cette fois-ci avec une faible intensité. Les autres bandes dites parasites ont tous disparu à l'exception d'une bande d'environ 625 pb qui a réapparue dans le profil de la souche 1113-5 (4) (Figure 22B).

Une troisième expérience avec le couple d'amorces AR13.1/AR13.2 a été réalisée avec une température d'hybridation de 62°C, et avec de nouvelles aliquotes d'ADN. La bande de 527 pb spécifique à la souche Ach 1-1 a été amplifiée, de même que la bande de taille similaire chez la souche MUCL 20326 (8). On a constaté aussi l'apparition d'une bande d'environ 700 pb de forte intensité dans le profil de la souche MUCL 19714 (12) (Figure 22C).

Un quatrième teste a été fait avec une température d'hybridation de 66°C. Cette expérience a débouché sur l'amplification de la bande attendue chez la souche Ach 1-1 ainsi que la bande de taille similaire chez la souche MUCL 20326 (8), mais cette fois-ci avec une intensité très forte et même semblable à celle de la bande amplifiée chez la souche Ach 1-1. La bande d'à peu près 700 pb a été de nouveau amplifiée chez la souche MUCL 19714 (12). (Figure 22D).

Le couple d'amorces AR13.1/AR13.2, a été rejeté à cause de sa non spécificité vis-à-vis de la souche Ach 1-1. Ce couple d'amorces SCAR testé, même à une température d'hybridation élevée (66°C), a parmi l'amplification chez la souche MUCL 20326 d'un fragment d'ADN de même taille que celui attendu chez la souche Ach 1-1, ainsi qu'une bande d'environ 700 pb chez la souche MUCL 19714.

Le profil PCR obtenu avec les amorces AR13.3/AR13.4 à température d'hybridation de 58°C, a montré une bande nette de 170 pb chez les souches Ach 1-1 (1), Ach 2-1 (2), Ach 2-2 (3), 1113-5 (4), 1113-10 (6), MUCL 20326 (8), MUCL 7862 (11), MUCL 19714 (12), par contre cette bande est absente chez les autres souches (Figure 23A).

L'emploi du couple d'amorces AR13.1/AR13.4 avec une température d'hybridation de 58°C a débouché sur l'amplification d'une bande de 245 pb chez toutes les souches d'*A. pullulans* testées à l'exception de la souche MUCL 6147(9) (Figure 23B).

Le profil PCR obtenu avec les amorces AR13.3/AR13.2 à température d'hybridation de 58°C a montré une bande amplifiée de taille attendue (452 pb) chez la souche Ach 1-1, cette bande est également présente avec une forte intensité chez les souches 1113-5 (4), MUCL 20326 (8) et MUCL 7862 (11), par contre elle est présente avec une faible intensité chez les souches Ach 2-1 (2), Ach 2-2 (3), 1113-10 (6), MUCL 7862 (11), MUCL 19714 (12). On a remarqué aussi la présence d'autres bandes de tailles variables, une bande d'à peu près 120 pb chez la souche

MUCL 43163 (14), une de 550 pb chez la souche Ach 2-1 (2) et la souche 1113-10 (6), et une bande de 700 pb présente dans le profil de la souche MUCL 19714 (12) (Figure 23C).

Le profil PCR de la souche Ach 1-1 obtenu avec le couple d'amorces AR13.5/AR13.6, utilisé à une température d'hybridation de 58°C, présente une bande amplifiée avec une forte intensité et de taille attendue (444 pb). Cependant une autre bande de même taille et aussi de forte intensité est observée dans le profil de la souche MUCL 20326 (8). On a constaté aussi la présence de cette bande de 444 pb avec une faible intensité dans le profil des souches 1113-5 (4), 1112-3 (5), 1113-10 (6). On a observé aussi la présence de bandes dont la taille varie entre 350 et 1200 pb chez les souches Ach 2-1 (2), 1113-5 (4), 1112-3 (5), 1113-10 (6), MUCL 6147(9), MUCL 19714 (12), MUCL 19360 (13) et MUCL 43163 (14). (Figure 23D).

L'emploi du couple d'amorces AR13.5/AR13.4 à température d'hybridation de 58°C a permis l'amplification d'une bande d'à peu près 198 pb, présente dans le profil de toutes les souches testées à l'exception des souches MUCL 22377 (7), MUCL 6147 (9), MUCL 8724 (10), MUCL 19360 (13) et MUCL 43163 (14) (Figure 24A)

Le couple d'amorces AR13.3/AR13.6 testé à une température d'hybridation de 58°C a généré une bande de 416 pb et de forte intensité dans le profile de la souche Ach 1-1, ainsi que dans le profil des souches Ach 2-1 (2) et MUCL 20326 (8). Ce couple d'amorce a été testé avec des températures d'hybridation de 60, 62, 64 et 66°C respectivement. À chaque fois les profils PCR obtenus étaient semblables à celui obtenu avec la température d'hybridation de 58°C (Figure 24B).

Le profil PCR de la souche Ach 1-1 obtenu avec le couple d'amorce AR13.5/AR13.2 à température d'hybridation de 58°C montre une bande de forte intensité d'environ 480 pb, une bande de même taille est observée dans le profile de la souche MUCL 8724 (10) mais avec une faible intensité. Les profils PCR des autres souches testées sont complexes, présentant des fragments d'ADN dont la taille varie entre 150 pb et 1032 pb et avec des intensités variables (Figure 24C).

Tous ces couples d'amorces testés, même à des températures d'hybridation élevées afin d'augmenter leur spécificité, n'ont pas permis l'obtention d'une bande SCAR spécifiquement présente dans le profil de la souche étudiée (Ach 1-1). Toutefois, le couple d'amorces SCAR

AR13.3/AR13.6 nous semble très intéressant, comparé aux autres couples amorces testés à la température d'hybridation de 58°C, il n'amplifiait en plus du marqueur SCAR attendu dans le profil de la souche Ach 1-1 que deux fragments d'ADN, un présent chez la souche Ach 2-1 et l'autre chez la souche MUCL 20326.

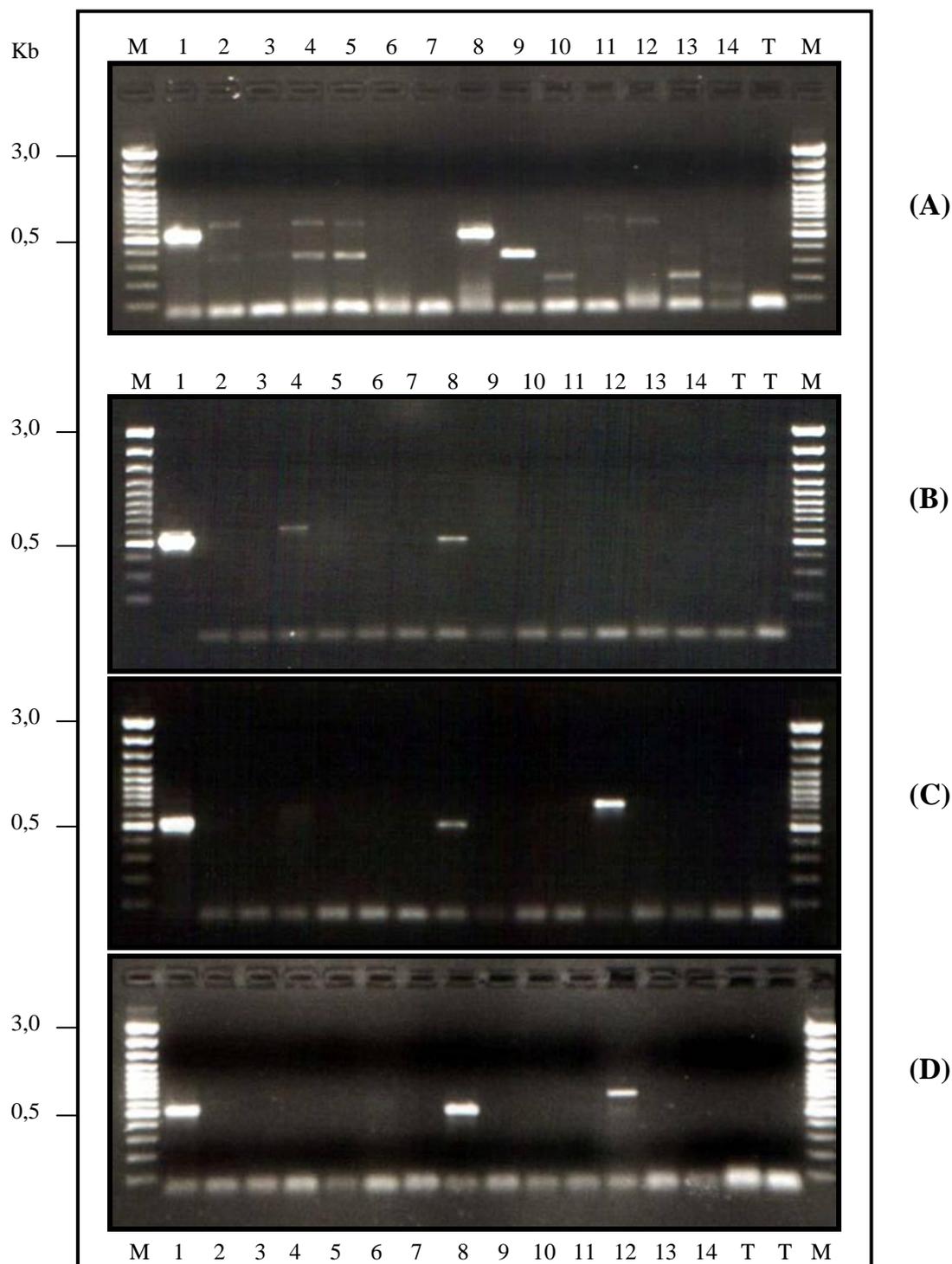


Figure 22 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits d'amplification obtenus par PCR avec le couple d'amorces AR13.1/AR13.2 sur l'ADN génomique des souches d'*Aureobasidium pullulans* étudiées. Les réactions ont été réalisées respectivement à des températures d'hybridation de 58°C (A), 60°C (B), 62°C (C) et 66 °C (D).

Ach 1-1 (1) ; Ach 2-1 (2) ; Ach 2-2 (3) ; 1113-5 (4) ; 1206-5 (5) ; 1113-10 (6) ; MUCL 22377 (7) ; MUCL 20326 (8) ; MUCL 6147(9) ; MUCL 8724 (10) ; MUCL 7862 (11) ; MUCL 19714 (12) ; MUCL 19360 (13) ; MUCL 43163 (14) ; M : Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin négatif sans ADN.

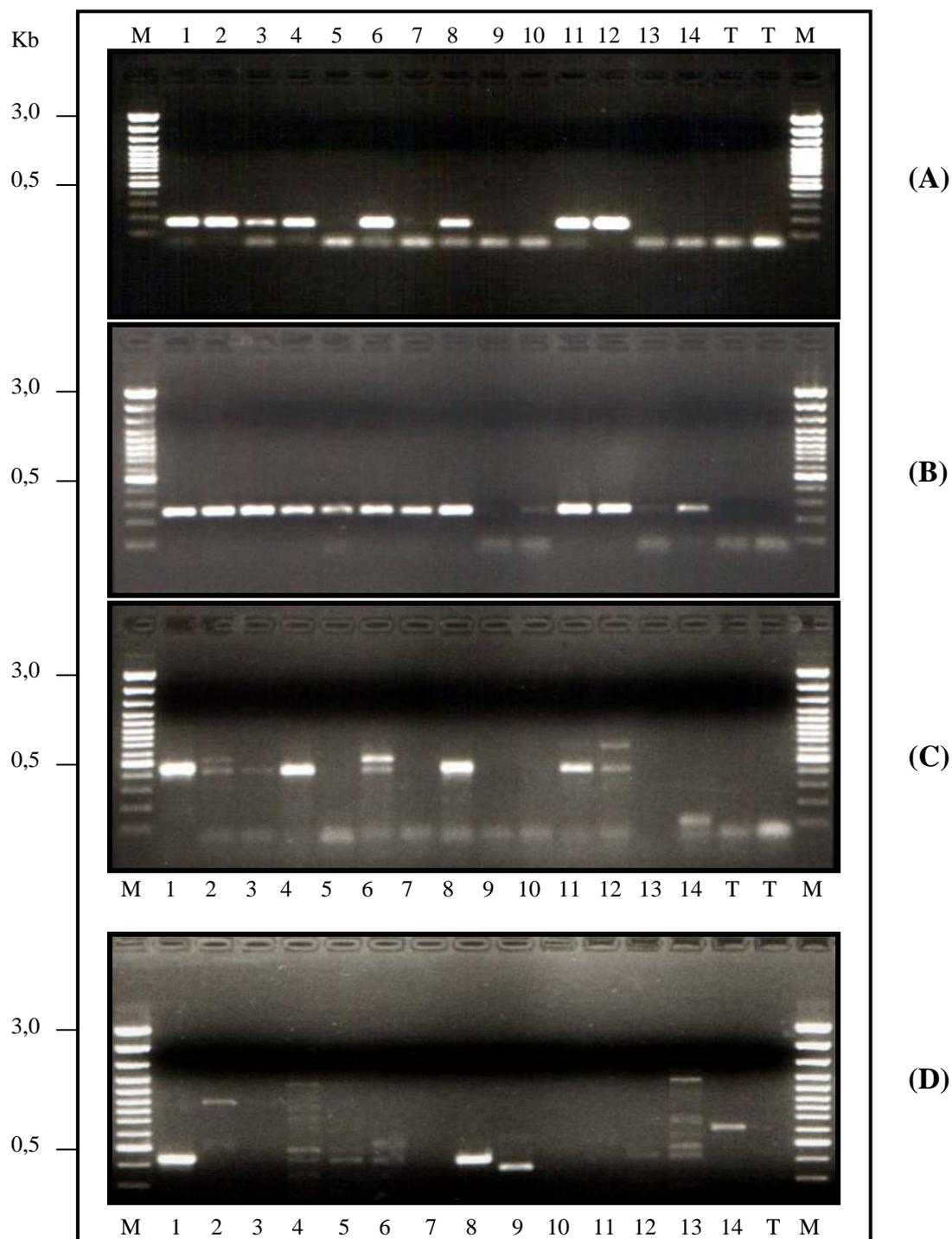


Figure 23 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits d'amplification obtenus par PCR avec les couples d'amorces AR13.3/AR13.4 (A), AR13.1/AR13.4 (B), AR13.2/AR13.3 (C) et AR13.5/AR13.6 (D) sur l'ADN génomique des souches d'*Aureobasidium pullulans* étudiées. Les réactions ont été réalisées à une température d'hybridation de 58°C.

Ach 1-1 (1) ; Ach 2-1 (2) ; Ach 2-2 (3) ; 1113-5 (4) ; 1206-5 (5) ; 1113-10 (6) ; MUCL 22377 (7) ; MUCL 20326 (8) ; MUCL 6147(9) ; MUCL 8724 (10) ; MUCL 7862 (11) ; MUCL 19714 (12) ; MUCL 19360 (13) ; MUCL 43163 (14) ; M: Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin négatif sans ADN.

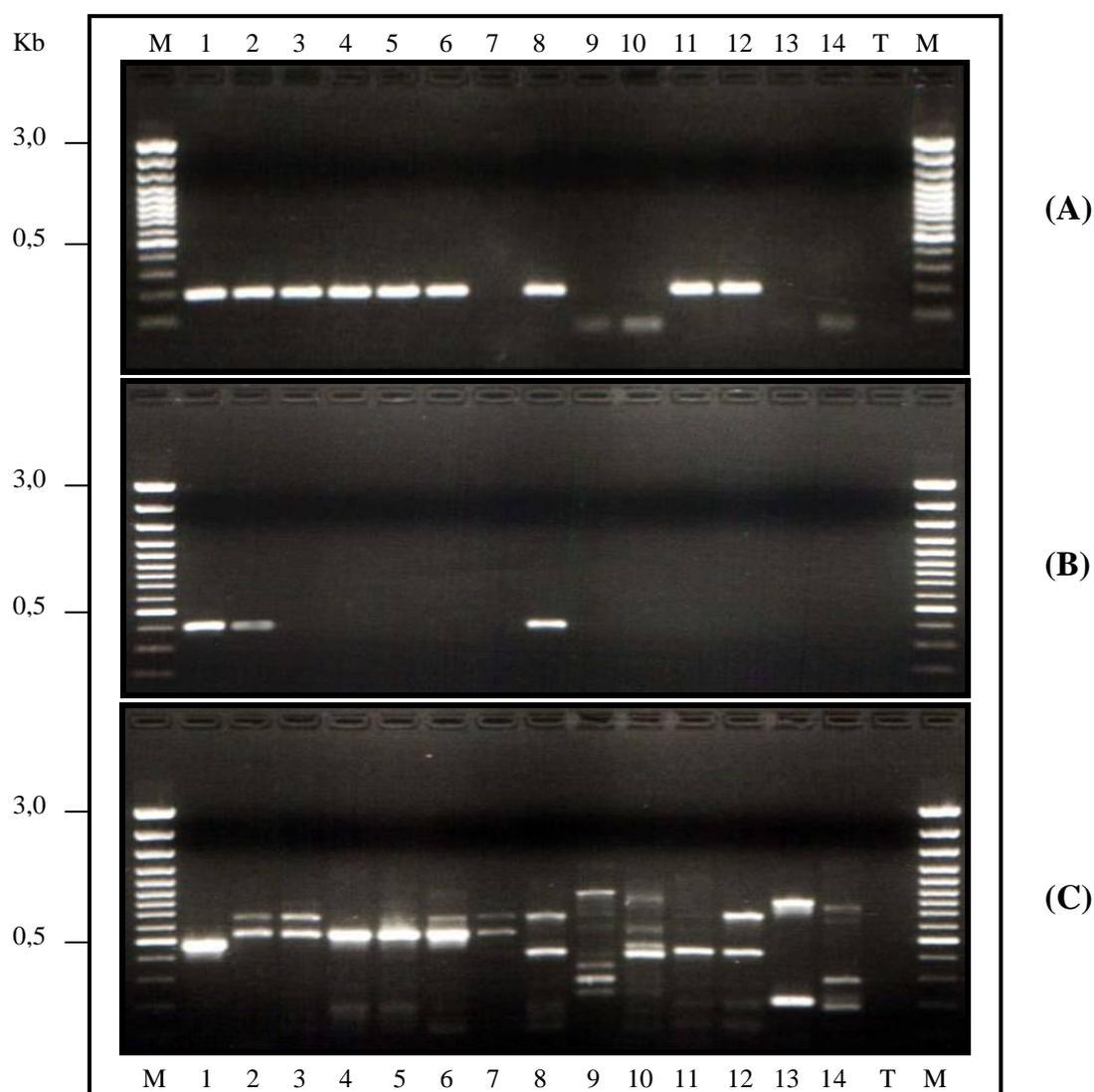


Figure 24 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits d'amplification obtenus par PCR avec les couples d'amorces AR13.5/AR13.4 (A), AR13.3/AR13.6 (B) et AR13.5/AR13.2 (C) sur l'ADN génomique des souches d'*Aureobasidium pullulans* étudiées. Les réactions ont été réalisées à une température d'hybridation de 58°C.

Ach 1-1 (1) ; Ach 2-1 (2) ; Ach 2-2 (3) ; 1113-5 (4) ; 1206-5 (5) ; 1113-10 (6) ; MUCL 22377 (7) ; MUCL 20326 (8) ; MUCL 6147(9) ; MUCL 8724 (10) ; MUCL 7862 (11) ; MUCL 19714 (12) ; MUCL 19360 (13) ; MUCL 43163 (14) ; M: Marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) ; T : Témoin négatif sans ADN.

4.3.1.1. Comparaison des séquences par alignement et conception de nouvelles amorces SCAR

Les trois bandes obtenues avec le couple d'amorce SCAR AR13.3/AR13.6 à partir de l'ADN des souches Ach 1-1, Ach 2-2 et MUCL 20326 (Figure 24B), ont été purifiées du gel d'agarose puis clonées et séquencées. Le séquençage de ces trois bandes a révélé respectivement pour chaque souche une séquence de 416 pb, 407 pb et 410 pb (Figure 25). La comparaison de ces trois séquences a été réalisée par alignement à l'aide du programme ClustalW (Figure 26).

Une identité de 95,51% a été déterminée entre la séquence de la souche Ach 1-1 et les séquences respectives des souches Ach 2-1 et MUCL 20326. La séquence de la souche Ach 1-1 présente dans la région localisée entre la position 32 et 49 une possibilité de concevoir une amorce potentiellement spécifique à la souche Ach 1-1. Cette région présente dans la position 40 à 45, six nucléotides (CCACTT) en plus par rapport aux séquences respectives des souches Ach 2-2 et MUCL 20326. Elle présente aussi deux SNP (single nucleotide polymorphism) entre la souche Ach 1-1 et MUCL 20326 à la position 47 et 49, ainsi qu'un polymorphisme de deux nucléotides à la position 33 à 34.

La région localisée entre la position 376 et 395 dans la séquence relative à la souche Ach 1-1 présente aussi des particularités intéressantes. En effet, cette région montre deux SNP entre la souche Ach 1-1 et la souche MUCL 20 326 à la position 391 et 394, ainsi qu'un polymorphisme de deux nucléotides à la position 377 à 378. Un polymorphisme d'absence de séquence (trois nucléotides) entre la souche Ach 1-1 et la souche Ach 2-1 est observé dans la position 391 à 393. D'autres SNP entre la souche Ach 1-1 et la souche MUCL 20 326 et qui sont au nombre de 26 sont présents à différentes positions.

Ces différences de séquences nous ont ouvert la possibilité de sélectionner de nouvelles couples d'amorces SCAR spécifiques à la souche Ach 1-1. Le tableau 16 donne les séquences de ces amorces, leur position de fixation ainsi que la taille des amplicons attendus.

SEQ DNAMAN SCAR Ach 1-1 : 416 bp;

Composition : 125 A; 122 C; 92 G; 77 T; 0 OTHER

Percentage : 30.0% A; 29.3% C; 22.1% G; 18.5% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 128.06 dsDNA: 256.47

```

1      ACTCCAACTC CCTGACGATG CGAAAATCCA CCCGGTATTC CACTTCCACA TATCACTCCT
61     TGAACCAGCA GACCCAGAAA CACCGTTGCA GACGACATTC CATTTCCAGA CAGAAGAAAA
121    CGACGAATTC GAAGTCGAAG AAATACTGGA ACAACGAGGT CAGCGATACC TTGTAAAATG
181    GAAAGGTTAC CCACCTTCAG ACAATACATG GGAACCACGA GGAAATCTTA AGAACTGCCA
241    GACCCTCCTG CGACGGTTTC ACCACGCAGC GAGAAGTCAA CGGCGTTGTT CATAAAATCC
301    ATCGCGGACC AGACAGCAGG AGACAAGCCG ACAGTCGCGT CAGCCGCAGG ACAGTCCTCG
361    TTGTCGTCTT CGACATCGAG CTCCCCCGCT GCTGACAAGT CGTGTGTGAT GTGCGA

```

(A)

SEQ DNAMAN SACR Ach 2-1 : 407 bp;

Composition : 124 A; 118 C; 91 G; 74 T; 0 OTHER

Percentage : 30.5% A; 29.0% C; 22.4% G; 18.2% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 125.35 dsDNA: 250.92

```

1      ACTCCAACTC CCTGACGATG CGAAAATCCA CCCGGTATTC CACATATCAC TCCTTGAACC
61     AGCAGACCCA GAAACACCGT TGCAGACGAC ATTCCATTTT CAGACAGAAG AAAACGACGA
121    ATTCGAAGTC GAAGAAATAC TGAACAACG AGGTCAGCGA TACCTTGTA AATGGAAAAG
181    TTACCCACCT TCAGACAATA CATGGGAACC ACGAGGAAAT CTTAAGA AACT GCCAGACCCT
241    CCTGCGACGG TTTTACCACG CAGCGAGAAG TCAACGGCGT TGTTTATAAA ATCCATCGCG
301    GACCAGACAG CAGGAGACAA GCCGACAGTC GCGTCAGCCG CAGGACAGTC CTCGTTGTCG
361    TCTTCGACAT CGAGCTCCCC CGCTGACAAG TCGTGTGTGTA TGTGCGA

```

(B)

SEQ DNAMAN SCAR MUCL 20326 : 410 bp;

Composition : 130 A; 95 C; 86 G; 99 T; 0 OTHER

Percentage : 31.7% A; 23.2% C; 21.0% G; 24.1% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 126.54 dsDNA: 252.74

```

1      ACTCCAACTC CCTGACGATG CGAAAATCCA CCTAGTATTC TATATATCAC TCCTTGAAC
61     AGCAGACCTA GAAACACCGT TGCAGACAAC ATTCCATTTT CAGACAGAAG AAAACGACGA
121    ATTCGAAGTC GAAGAAATAC TAGAATAACG AGGTTAGCGA TACCTTGTA AATGGAAAAG
181    TTACCCACCT TTAGACAATA TATAGGAACT ACGAGGAAAT CTTAAGA AACT GCTAGACCCT
241    CCTGCGACGG TTTTACTACG TAGCGAGAAG TTAACGGCGT TGTTTATAAA GTCCATCGCG
301    GACTAGACAG TAGGGGATAA GCCGATAGTC GCGTTAGCCG TAGGATAGTC CTCGTTATCG
361    TCTTCGACAT TAAGCTCCCC CGCTACTAAC AAGTCGTGTT GTATGTGCGA

```

(C)

Figure 25 : Séquences des bandes générées chez les souches Ach 1-1 (A), Ach 2-1 (B) et MUCL 20326 (C) avec le couple d'amorces SCAR AR13.3/AR13.6.

Tableau 16 : Position des nouvelles amorces SCAR et taille des amplicons attendus chez la souche Ach 1-1

Couple d'amorce	Code	Séquence (5' - 3')	Position ^a	Taille du produit (pb)
1	AR13.7	CACCCGGTATTCCACTTCCAC	29 à 49	190
	AR13.10	GTGGTTCCCATGTATTGTCTGA	197 à 218	
2	AR13.9	CACCACGCAGCGAGAAGTCA	260 à 279	135
	AR13.8	CAGCAGCGGGGAGCTCGAT	375 à 394	
3	AR13.7	CACCCGGTATTCCACTTCCAC	29 à 49	366
	AR13.8	CAGCAGCGGGGAGCTCGAT	375 à 394	
4	AR13.9	CACCACGCAGCGAGAAGTCA	260 à 279	157
	AR13.11	CATAAACACGACTTGTTCAGC	391 à 416	
5	AR13.7	CACCCGGTATTCCACTTCCAC	29 à 49	388
	AR13.11	CATAAACACGACTTGTTCAGC	391 à 416	

^a Position dans la séquence de la bande SCAR obtenue chez la souche Ach 1-1 par utilisation de la paire d'amorces SCAR AR13.3/AR13.6.

4.3.1.2. Vérification de la spécificité des nouveaux couples d'amorces SCAR

Afin d'évaluer la spécificité des couples d'amorces choisis (Tableau 16) une PCR a été réalisée sur l'ADN génomique des 14 souches d'*Aureobasidium pullulans* avec une température d'hybridation de 62°C. La figure 27 représente les résultats d'amplification après migration sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium et visualisation sous UV.

Les couples d'amorces SCAR AR13.7/AR13.10, AR13.7/AR13.11 et AR13.9/AR13.11, testés avec une température d'hybridation de 62 °C, ont permis l'obtention de trois marqueurs SCAR spécifiques à la souche Ach 1-1, avec des tailles de 190 pb, 388 pb et 157 pb respectivement (Figure 27A, B et C). Pour s'assurer de la reproductibilité de ces résultats les couples d'amorces ont été testés trois fois sur des préparations d'ADN différentes.

Par contre l'emploi des couples d'amorces AR13.7/AR13.8 et AR13.9/AR13.8 à température d'hybridation de 62°C n'a pas permis l'obtention d'un fragment SCAR spécifique à la souche Ach 1-1. Les profils d'amplification obtenus avec ces deux couples d'amorces ont montré en plus des bandes SCAR attendues chez la souche Ach 1-1 une ou plusieurs bandes chez les autres souches d'*Aureobasidium pullulans* testées et dont la taille varie entre 135 pb et 1050 pb.

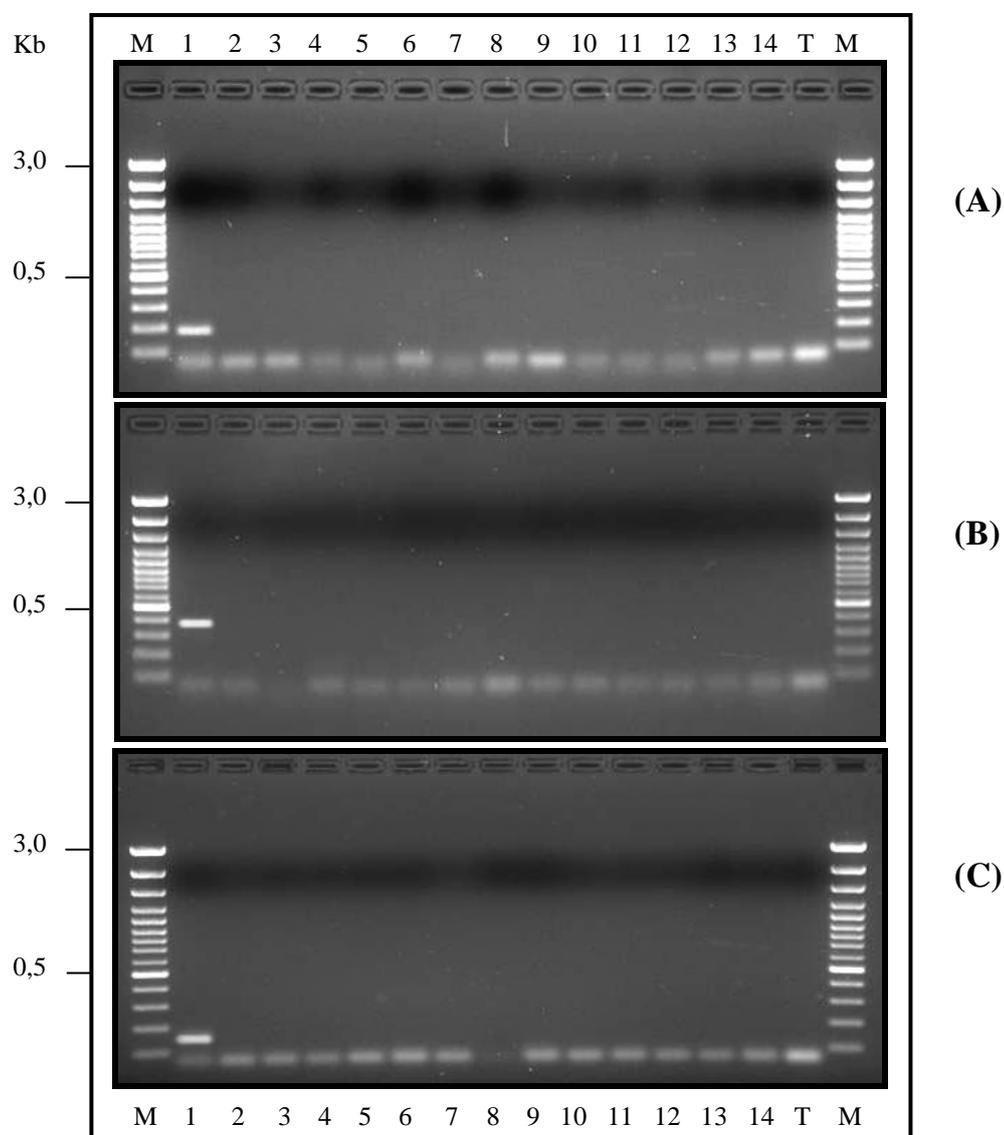


Figure 27 : Amplification PCR des trois marqueurs SCAR spécifiques à la souche Ach 1-1 par utilisation respective des couples d'amorces AR13.7/AR13.10 (A), AR13.7/AR13.11 (B) et AR13.9/AR13.11 (C). Les réactions ont été réalisées à une température d'hybridation de 62°C.

Ach 1-1 (1) ; Ach 2-1 (2) ; Ach 2-2 (3) ; 1113-5 (4) ; 1113-10 (5) ; 1206-5 (6) ; MUCL 19360 (7) ; MUCL 19714 (8) ; MUCL 43163 (9) ; MUCL 7862 (10) ; MUCL 8724 (11) ; MUCL 20326 (12) ; MUCL 6147 (13) ; MUCL 22377 (14) ; control négatif (sans ADN) (T) ; M : Marqueur de taille GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas).

4.3.2. Sélection d'amorces SCAR relatifs à la souche 1113-5

Dans l'objectif d'évaluer la spécificité des couples d'amorces SCAR choisis pour l'identification de la souche 1113-5, une PCR avec une température d'hybridation de 60°C a été réalisée sur l'ADN génomique des 14 souches d'*Aureobasidium pullulans*.

Les couples d'amorces testés, leurs positions sur la séquence ainsi que la taille des amplicons attendus sont représentés sur le tableau 17.

Tableau 17 : Position des amorces SCAR et taille des produits attendus chez la souche 1113-5

Couple d'amorce	Code	Position ^a	Taille du produit (pb)
1	AQ3.1	1 à 23	
	AQ3.2	410 à 431	431
2	AQ3.1	1 à 23	
	AQ3.4	339 à 358	358
3	AQ3.1	1 à 23	
	AQ3.6	303 à 323	323
4	AQ3.1	1 à 23	
	AQ3.8	165 à 184	184
5	AQ3.3	186 à 206	
	AQ3.2	410 à 431	246
6	AQ3.3	186 à 206	
	AQ3.4	339 à 358	173
7	AQ3.3	186 à 206	
	AQ3.6	303 à 323	138
8	AQ3.5	160 à 179	
	AQ3.2	410 à 431	272
9	AQ3.5	160 à 179	
	AQ3.4	339 à 358	199
10	AQ3.5	160 à 179	
	AQ3.6	303 à 323	164
11	AQ3.7	251 à 272	
	AQ3.2	410 à 431	181
12	AQ3.7	251 à 272	
	AQ3.4	339 à 358	108

^a Position dans la séquence du marqueur RAPD spécifique à la souche 1113-5 généré par utilisation de l'amorce OPQ-03.

Parmi les 12 couples d'amorces SCAR testés, seul le couple d'amorces AQ3.1/AQ3.2 issu de l'élongation de l'amorce RAPD OPQ-03, a permis l'amplification d'une bande SCAR de 431 pb présente uniquement dans le profile de la souche 1113-5 (Figure 28). Pour s'assurer de la reproductibilité de ce résultat le couple d'amorces AQ3.1/AQ3.2 a été testé trois fois sur des préparations d'ADN différentes.

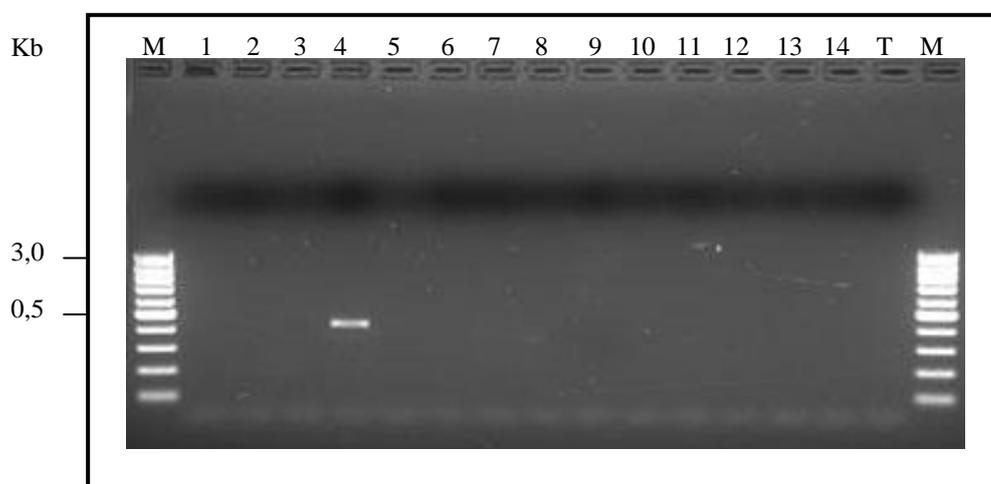


Figure 28 : Amplification PCR du marqueur SCAR spécifique à la souche 1113-5 par utilisation du couple d'amorces AQ3.1/AQ3.2. Les réactions d'amplification ont été réalisées à une température d'hybridation de 60°C.

Ach 1-1 (1) ; Ach 2-1 (2) ; Ach 2-2 (3) ; 1113-5 (4) ; 1113-10 (5) ; 1206-5 (6) ; MUCL 19360 (7) ; MUCL 19714 (8) ; MUCL 43163 (9) ; MUCL 7862 (10) ; MUCL 8724 (11) ; MUCL 20326 (12) ; MUCL 6147 (13) ; MUCL 22377 (14) ; contrôle négatif (sans ADN) (T) ; M : Marqueur de taille GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas).

Les trois couples d'amorces SCAR (AR13.7/AR13.10, AR13.7/AR13.11 et AR13.9/AR13.11) permettant d'identifier spécifiquement la souche Ach 1-1, et le couple d'amorces SCAR (AQ3.1/AQ3.2) spécifique à la souche 1113-5, ont été aussi testés sur l'ADN génomique extrait à partir de huit autres souches appartenant à différentes espèces de levures communément isolées de la surface des pommes (Tableau 1) ainsi que sur de l'ADN extrait de la microflore épiphytique de la surface des pommes. Les résultats obtenus n'ont montré aucune amplification.

5. TRAÇAGE DES SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5 À LA SURFACE DES POMMES

Le suivi de l'évolution des populations de nos deux souches de levures antagonistes, appliquées sur pommes puis stockées en chambre froide à 4°C, a été réalisé sur une période de deux mois par utilisation d'une procédure de traçage mixte.

Les étapes de cette procédure de traçage mixte étaient les suivantes : (1) récupération des microorganismes par lavage des pommes ; (2) étalement des eaux de lavage sur milieu semi-sélectif S₃₂ et comptage des ufc ; (3) analyse des colonies par PCR et (4) expression du nombre de cellules des souches Ach 1-1 et 1113-5 récupérées à la surface des pommes (ufc/cm²) en fonction du temps (deux heures avant stockage, puis 2, 7, 14, 21, 28, 35, 49 et 60 jours après stockage).

La surface moyenne des pommes Golden Delicious utilisées dans cette expérience a été évaluée par utilisation de l'équation reliant la surface d'une pomme et le volume d'eau déplacé par celle-ci (cf. Matériel et méthodes, paragraphe 4.2). Elle était estimée à 195 cm².

Les résultats du traçage mixte de nos deux souches étudiées, sont représentés sur la figure 29 ainsi que sur un tableau en annexe 7. La densité des populations de levures présentes à la surface de la pomme après deux heures de leur application était de 1,43x10⁴ ufc/cm² et de 1,47x10⁴ ufc/cm², respectivement pour la souche Ach 1-1 et 1113-5. Après deux jours de stockage à 4°C, ces densités de populations ont chuté de 23% et de 20% pour la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 respectivement. Après cette phase de déclin on a constaté pour la souche Ach 1-1 une augmentation de population au 7^{ème} jour de stockage, pour atteindre une quantité semblable à celle de départ (1,4x10⁴ ufc/cm²), et qui est restée stable jusqu'au 21^{ème} jour de conservation. Au-delà du 21^{ème} jour de stockage on a observé une décroissance graduelle de la quantité de population de la souche Ach 1-1 pour se stabiliser à une quantité d'environ 6x10³ ufc/cm² durant les sept derniers jours de la période de stockage. Pour la souche 1113-5, au 7^{ème} jour de stockage, on a constaté une croissance plus importante par rapport à la souche Ach 1-1, pour atteindre un niveau de population de 1,8x10⁴ ufc/cm² dépassant celui trouvé deux heures après application des levures sur pommes. Au-delà du 7^{ème} jour le niveau de population de la souche 1113-5 a rechuté pour se stabiliser jusqu'au 28^{ème} jour à une valeur d'à peu près 1,2x10⁴ ufc/cm². Après

cette phase de stabilité la quantité de population de la souche 1113-5 a subi une 3^{ème} phase de décroissance avant de devenir stable à partir du 49^{ème} jour et ceci jusqu'à la fin de la période du stockage avec une densité d'à peu près 5×10^3 ufc/cm².

Pour les pommes non traitées la densité de population des levures ayant une morphologie semblable à celle des *A. pullulans* était de $1,53 \times 10^3$ ufc/cm² avant stockage des pommes, c'est-à-dire à peu près 9 fois inférieure à celle observée à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 ou bien avec la souche 1113-5. Après stockage des pommes la population des *A. pullulans* n'a jamais dépassé $1,5 \times 10^3$ ufc/cm², et elle a continué à chuter jusqu'à disparition totale à partir du 49^{ème} jour de la période de conservation des pommes.

Concernant l'identification de nos deux agents de lutte biologique, elle a été réalisée à l'aide des deux couples d'amorces SCAR suivant : le couple d'amorces AR13.7/AR13.10 générant une bande de 190 pb spécifique à la souche Ach 1-1 et le couple d'amorces AQ3-1/AQ3-2 permettant l'amplification d'une bande de 431 pb spécifique à la souche 1113-5.

Le pourcentage des levures identifiées comme étant la souche Ach 1-1 était de 99 %, par contre pour la souche 1113-5 le pourcentage des levures identifiées comme étant la souche 1113-5 était de 92 % (Figures 30 et 31).

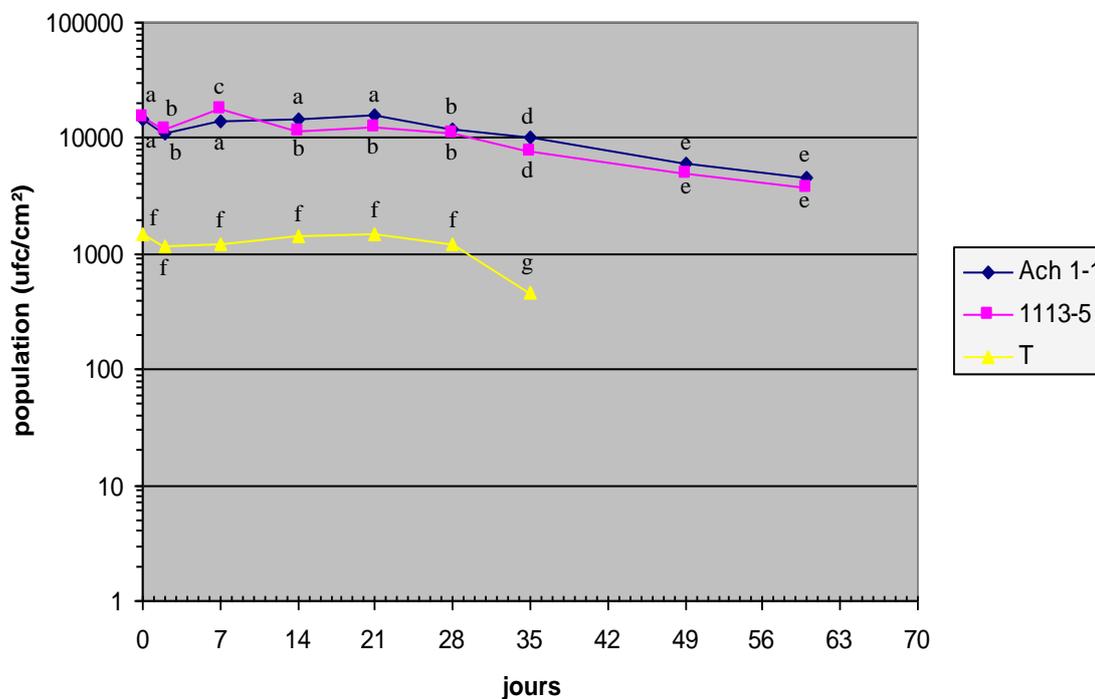


Figure 29 : Dynamique de population d'*A. pullulans* à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 ou la souche 1113-5 et des pommes non traitées (T : Témoin). Les pommes ont été traitées avec une suspension de levures (Ach 1-1 ou 1113-5) à 10^7 ufc/mL puis laissées séchées pendant deux heures avant stockage. Le niveau de population a été évalué deux heures après traitement, puis 2, 7, 14, 21, 28, 35, 49 et 60 jours après stockage à 4°C. Chaque valeur correspond à une moyenne de quatre répétitions et deux essais dans le temps. Les densités de populations suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Duncan). Les valeurs des densités de populations sont représentées en échelle Logarithmique.

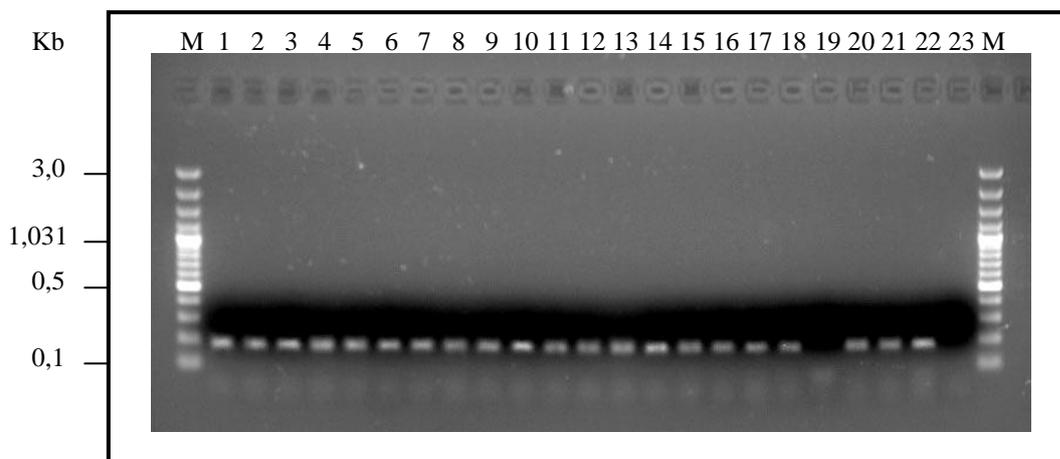


Figure 30 : Exemple d'Analyse par PCR des colonies d'*A. pullulans* issues des eaux de lavage des pommes traitées avec la souche Ach 1-1. L'amplification a été effectuée à l'aide du couple d'amorces AR13.7/AR13.10 à une température d'hybridation de 62°C.

Les puits numérotés de 1 à 21 correspondent à l'ADN isolés à partir des colonies à analyser, les puits 22 et 23 correspondent au témoin positif (ADN de la souche Ach 1-1) et au témoin négatif (sans ADN) respectivement. M : marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas).

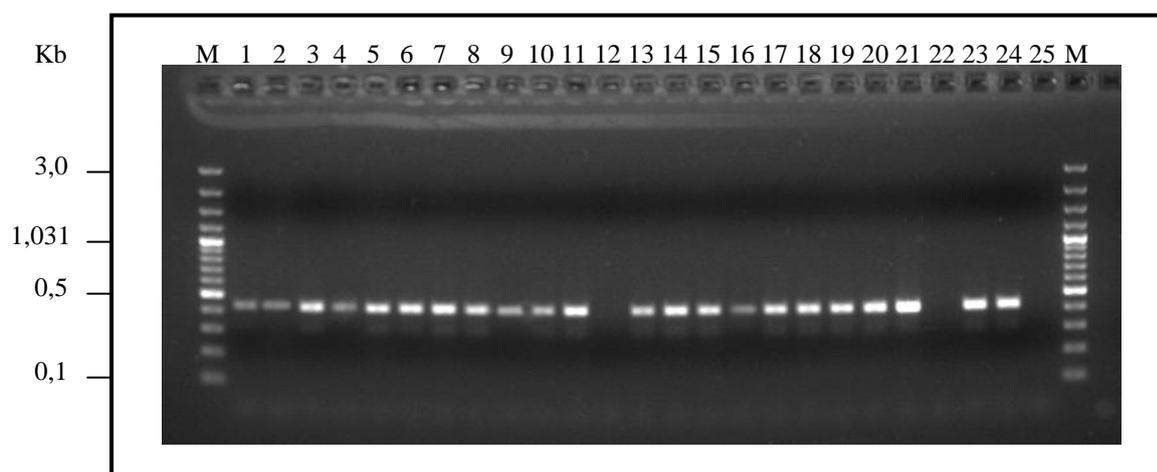


Figure 31 : Exemple d'Analyse par PCR des colonies d'*A. pullulans* issues des eaux de lavage des pommes traitées avec la souche 1113-5. L'amplification a été effectuée à l'aide du couple d'amorces AQ3.1/AQ13.2 à une température d'hybridation de 60°C.

Les puits numérotés de 1 à 23 correspondent à l'ADN isolés à partir des colonies à analyser, les puits 24 et 25 correspondent au témoin positif (ADN de la souche 1113-5) et au témoin négatif (sans ADN) respectivement. M : marqueur de taille Generuler™ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas).

Chapitre IV :

DISCUSSION

« De la discussion jaillit la lumière ».
[Proverbe indien]

De l'évaluation du marché et des besoins potentiels à la commercialisation, la mise en application pratique d'une stratégie de lutte biologique à base de microorganismes antagonistes (biopesticides) s'effectue en plusieurs étapes : (1) isolement des souches antagonistes ; (2) évaluation de leur activité antagoniste en laboratoire puis en conditions réelles (champ, verger, serre ou chambre de stockage) ; (3) étude de l'écologie des souches d'intérêt (adaptation des souches aux conditions environnementales et impact sur l'environnement) ; (4) étude des modes d'actions ; (5) évaluation des différents modes d'applications et de productions en masse en relation avec les agents de formulation et enfin (6) homologation avant commercialisation.

Les étapes telles que l'homologation, l'étude de l'écologie, l'optimisation de la formulation et du mode d'application nécessitent le développement d'un outil de traçage. Le traçage permet d'identifier l'agent de biocontrôle et suivre la dynamique de sa population en fonction du temps ou à la suite d'une perturbation de son environnement. Cette étude permet donc d'évaluer (1) l'adaptation et la survie de l'antagoniste parmi la microflore naturellement présente sur les fruits, (2) l'efficacité des différentes formulations et méthodes d'application de l'antagoniste (pulvérisation en pré-récolte ou trempage/douchage en post-récolte) et (3) l'impact et la persistance de l'organisme dans l'environnement. Outre ces aspects, le traçage a comme objectif fondamental d'identifier la souche d'intérêt afin de protéger son utilisation et sa commercialisation.

Les méthodes développées pour le traçage des agents de biocontrôle peuvent être classées en trois catégories principales : **les méthodes microbiologiques** (classiques ou traditionnelles), **les méthodes directes** et **les méthodes moléculaires**. Quelque soit la méthode utilisée, les deux étapes essentielles à la mise au point d'un système de traçage sont le choix d'une technique d'identification (marquage) et une technique de quantification adaptées au microorganisme étudié.

Dans le présent travail de thèse, une méthode de **traçage mixte**, alliant la simplicité de la technique de quantification par étalement sur un milieu de culture semi-sélectif (traçage microbiologique) avec la spécificité d'un marquage moléculaire (marqueurs SCAR), a été mise au point pour identifier et quantifier nos deux souches antagonistes (Ach 1-1 et 1113-5) appartenant à l'espèce *Aureobasidium pullulans*. Cette technique de traçage a été par la suite utilisée en conditions pratiques afin d'étudier la capacité de survie et de persistance de nos deux agents antagonistes à la surface des pommes en condition de stockage à froid.

Le développement de cette méthode de traçage s'inscrit dans le cadre global de développement d'un biopesticide pour le contrôle des maladies fongiques des pommes en conservation, principalement causées par les parasites de blessures *B. cinerea* et *P. expansum*.

Le développement de notre méthode de traçage mixte a nécessité la réalisation des étapes suivantes : (1) la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif facilitant la détection et la quantification de nos deux souches cibles après leurs re-isolément de la surface des pommes ; (2) la détection de polymorphismes génétiques au niveau du génome des souches Ach 1-1 et 1113-5 par utilisation de la technique RAPD permettant de les différencier des autres souches de la même espèce ; (3) la sélection de fragments RAPD amplifiés de façon spécifique dans le profil de nos deux souches étudiées pour le développement de marqueurs SCAR ; (4) la conception d'amorces SCAR pour la détection spécifique de nos deux souches cibles par utilisation d'une simple réaction PCR.

1. DÉVELOPPEMENT DU MILIEU SEMI-SÉLECTIF

Dans l'objectif de faciliter la détection et l'énumération d'*A. pullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5 parmi la microflore épiphytique de la surface des pommes, un milieu de culture semi-sélectif noté S₃₂ a été développé. Il s'agit d'un milieu de base de culture des levures (milieu PDA) amendé avec 0,5 mg/L d'Euparen, 1 mg/L de Sumico, 2,5 mg/L d'Hygromycine B, 30 mg/L de Streptomycine sulfate et 1 mg/L de Cycloheximide.

À notre connaissance, le milieu S₃₂ est le premier milieu de culture semi-sélectif développé pour l'isolement et la quantification d'agents de biocontrôle appartenant à l'espèce *A. pullulans*. Il est composé de deux fongicides (l'Euparen et le Sumico) et trois antibiotiques (l'Hygromycine B, la Streptomycine sulfate et la Cycloheximide).

Le Sumico a dans sa composition deux matières actives (Carbendazime et Diéthofencarbe) appartenant respectivement aux familles des Benzimidazoles et Phénylcarbammates, tandis que l'Euparen n'en comporte qu'une seule (Tolyfluanide) appartenant à la famille des Sulfamides. Le fait que ces deux formulations comportent trois différentes familles de matières actives signifie que celles-ci agissent à des sites d'action distinctes, ce qui diminuera la probabilité de développement d'une résistance à ces matières actives par les champignons pathogènes,

potentiellement présents à la surface des pommes, et par conséquent entraînerai une perte d'efficacité de notre milieu de culture semi-sélectif.

Quant aux antibiotiques, ils ont tous les trois un large spectre d'action qui touche la plupart des champignons, des bactéries et des cellules eucaryotes. Ils agissent tous par inhibition de la synthèse des protéines mais avec des modes d'actions différents. La Streptomycine sulfate inhibe la synthèse des protéines par sa liaison avec la protéine S12 du 30S ribosomal et par inhibition de sa propre translocation. L'Hygromycine B interfère avec la translocation et causerait des erreurs de traduction. La Cycloheximide inhibe le transfert des acides aminés à partir des t-RNAs vers les polypeptides.

Bien que, l'utilisation des antibiotiques en traitement phytosanitaire, dans de nombreux pays, soit strictement interdite ou sévèrement réglementée, la littérature signale certains essais entrepris sur des végétaux. Ainsi, la Streptomycine a été essayée contre les mildious et surtout contre les bactérioses. Aux états unis d'Amérique, son utilisation contre le feu bactérien (*Erwinia amylovora*) est importante, mais en combinaison avec la Terramycine, afin d'éviter l'apparition de souches résistantes (Corbaz, 1990).

Dans la mise au point de notre milieu de culture semi-sélectif deux aspects ont été pris en compte : la toxicité et la sélectivité du milieu. En terme de toxicité, notre milieu a été considéré non toxique vis-à-vis la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5 (taux de viabilité supérieure à 90%). Au niveau spécificité le milieu semi-sélectif retenu a totalement empêché le développement de la microflore de l'air et il a fortement inhibé le développement de la microflore naturellement présente à la surface de pommes Golden Delicious. Ce point est d'une importance majeure puisque notre milieu de culture semi-sélectif sera utilisé en conditions pratiques pour quantifier la population de nos deux souches antagonistes parmi une population complexe de microorganismes (champignons, levures et bactéries) présente naturellement à la surface de pommes.

La résistance de nos deux agents de biocontrôle à certains fongicides testés dans cette étude, et qui sont communément utilisés en verger, peut être aussi exploitée pour le développement de programmes de lutte intégrée. L'intégration de fongicides avec des agents du biocontrôle offre l'opportunité de réduire la quantité de fongicides appliqués en pré- et/ou en post-récolte, et donc diminuer le taux de résidus toxiques sur les produits végétaux commercialisés.

Des agents de biocontrôle ont été déjà efficacement utilisés avec des doses très réduites de fongicides chimiques pour lutter contre les maladies fongiques de certaines cultures en serre (Elad et *al.*, 1996) et en post-récolte (Chand-Goyal et Spotts, 1997 ; Droby et *al.*, 1998). À titre d'exemple l'isolat LS30 d'*A. pullulans* utilisé avec une dose très réduite, 10% de la dose commercialement recommandée, d'un fongicide (Benomyl), a présenté une activité protectrice sur des fruits de pommes comparable à celle du fongicide appliqué avec la dose recommandé par le producteur (Lima et *al.*, 2003). Un autre isolat d'*A. pullulans*, l'isolat L47, a donné de meilleurs résultats de protection sur fraises et raisins de table lorsqu'il a été utilisé en combinaison avec une dose réduite de fongicides comparé à l'utilisation de l'agent antagoniste seul (Ippolito et *al.*, 1997 et 1998 : cité par Ippolito et Nigro, 2000).

L'utilisation de notre milieu de culture semi-sélectif (milieu S₃₂) pour la détection et la quantification de nos deux agents antagonistes (traçage microbiologique), après leur application sur pommes, présente de nombreux avantages tels que : (1) la simplicité de mise en oeuvre, (2) la quantification des cellules vivantes et (3) un coût réduit. Par contre elle présente aussi certains inconvénients : (1) le temps requis pour l'obtention de résultats peut être assez long, trois à quatre jours ; (2) la fiabilité des résultats obtenus est confrontée à des erreurs d'identification dues aux similitudes morphologiques entre nos deux souches étudiées ainsi qu'avec d'autres souches apparentées. En effet, un milieu de culture semi-sélectif, par définition, ne permet pas de discriminer entre des souches proches appartenant à la même espèce ou bien appartenant à d'autres espèces présentant des caractéristiques morphologiques similaires. De plus, la plupart des milieux de culture signalés dans la littérature pour la détection et l'énumération des agents de biocontrôle sont semi-sélectifs (Lima et *al.*, 1997 ; Schena et *al.*, 2003 ; De Clercq et *al.*, 2003 ; Pujol et *al.*, 2005 ; Massart et *al.*, 2005 ; Nunes et *al.*, 2008).

Le manque de spécificité des milieux de culture semi-sélectifs peut mener à des erreurs d'identification qui vont à leurs tours engendrer des erreurs de quantification qui peuvent être assez importantes. Cette limitation peut être particulièrement significative dans le cas des *A. pullulans*, et ceci à cause de leur large distribution dans l'environnement et à cause de leur variabilité génétique élevée (Hermanides-Nijhof, 1977 ; Yurlova et *al.*, 1995, 1999 ; Schena et *al.*, 1999, 2002). Ce manque de spécificité peut être surmonté par utilisation de marqueurs génétiques (moléculaires) permettant une identification beaucoup plus précise des souches ciblées. De plus, l'utilisation d'approches moléculaires pour caractériser les différents isolats antagonistes d'une même espèce présente une importance primordiale dans le domaine de la lutte

biologique, vue que des isolats présentant le même phénotype peuvent avoir des modes de biocontrôle considérablement différent (Leibinger et *al.*, 1997 ; Droby et *al.*, 1998).

2. IDENTIFICATION DE MARQUEURS RAPD SPÉCIFIQUES AUX SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5

Pour obtenir des marqueurs génétiques naturels permettant la discrimination de nos deux souches d'intérêt par rapport aux autres souches de la même espèce, la technique RAPD a été utilisée. Cette technique a été choisie pour sa rapidité, sa faible technicité et sa capacité potentielle de détecter des marqueurs moléculaires spécifiques sans connaissance préalable du génome de la souche cible. La technique RAPD a été déjà utilisée avec succès pour obtenir des marqueurs moléculaires spécifiques pour de nombreux agents de lutte biologique (Abbasi et *al.*, 1999 ; Chapon et *al.*, 2000 ; Schena et *al.*, 2002 ; De Clercq et *al.*, 2003 ; Pujol et *al.*, 2005 ; Nunes et *al.*, 2008).

Dans le présent travail, la technique RAPD a permis de révéler un polymorphisme génétique important entre les 15 souches d'*A. pullulans* testées. En effet toutes les amorces testées ont produit des profils RAPD différents d'une souche à l'autre. Ce polymorphisme génétique important observé entre les différentes souches d'*A. pullulans* pourrait être expliqué principalement par des différences au niveau du nombre, de la taille et de l'intensité des bandes amplifiées. Dans le premier cas, la différence de nombre de bande pourrait être attribuée à la variabilité de fréquence des sites de fixation des amorces RAPD sur l'ADN matrice. La différence de taille observée entre les bandes amplifiées pourrait être due à des mutations d'insertion ou de délétion dans les régions amplifiées ou au niveau des sites de fixation de l'amorce. La variabilité dans l'intensité d'amplification des bandes pourrait être due à une variabilité dans le degré de complémentarité (mis-match ou mésappariement) entre l'amorce et la séquence d'ADN cible.

Le polymorphisme génétique élevé, trouvé dans cette étude, entre toutes les souches d'*A. pullulans* testées, concorde avec les travaux menés par Schena et *al.* (1999 et 2003), dans lesquels ils ont trouvé, par utilisation de la technique RAPD, une très grande variabilité génétique entre les souches d'*A. pullulans* isolées sur différents fruits et légumes dans le sud d'Italie. Nos résultats sont aussi en accord avec les résultats de recherche rapportés par Yurlova

et *al.* (1995), dans lesquels des amorces universels (UP-PCR) ont été utilisées pour démontrer un haut degré d'hétérogénéité parmi les *A. pullulans*.

Certains auteurs ont rapporté que les *A. pullulans* peuvent se comporter comme de potentiels agents pathogènes sur fruits de pommes (Matteson et *al.*, 1997) et de cerises (Dugan et Roberts, 1994). Cependant, la grande variabilité génétique entre les isolats épiphytiques d'*A. pullulans* établie dans cette étude et dans d'autres études (Yorlova et *al.*, 1995, 1997 et 1999 ; Schena et *al.*, 1999 et 2003), peut bien expliquer les différentes activités biologiques des souches de cette espèce. De plus, Matteson et *al.* (1997) ont rapporté que l'apparition de symptômes sur les pommes a été fortement liée aux types de souches d'*A. pullulans* utilisées et nécessitait des conditions environnementales bien spécifiques.

Nos deux souches antagonistes Ach 1-1 et 1113-5, n'ont jamais présenté aucun symptôme de pathogénicité sur les fruits de pommes Golden Delicious. Toutefois, des études supplémentaires doivent être établies pour confirmer l'absence de toute activité pathogène sur d'autres hôtes.

La grande variabilité génétique entre les souches d'*A. pullulans* testées dans notre étude a plus au moins favorisé la découverte de fragments amplifiés de façon spécifique dans les profils RAPD des souches Ach 1-1 et 1113-5. En effet nous avons pu identifier huit marqueurs RAPD spécifiques : cinq pour la souche Ach 1-1 et trois pour la souche 1113-5 (cf. Tableaux 11 et 13).

Tous les marqueurs RAPD spécifiques détectés dans ce travail de thèse peuvent être utilisés pour identifier chacune de nos deux souches cibles. Toutefois, nous avons choisi de les convertir en une nouvelle classe de marqueurs, appelés marqueurs SCAR (Paran et Michelmore, 1993). Comparés aux marqueurs RAPD, les marqueurs SCAR présentent de nombreux avantages : (1) ils permettent de simplifier l'identification de la souche cible par amplification spécifique d'un seul fragment PCR au lieu d'un profil d'amplification, (2) ils sont plus spécifiques puisqu'ils ciblent une séquence connue et (3) ils sont reproductibles.

3. CONVERSION DE MARQUEURS RAPD EN MARQUEURS SCAR

Dans la littérature on trouve pas mal d'exemples de développement de marqueurs SCAR à partir de marqueurs RAPD chez plusieurs agents de lutte biologique, y compris des agents appartenant

à l'espèce *A. pullulans* (Schena et al., 2002 ; De Clercq et al., 2003 ; Pujol et al., 2005 ; Nunes et al., 2008 ; Loncaric et al., 2008 ; Chen et al., 2010).

Dans notre étude, pour chaque souche cible, un marqueur RAPD spécifique a été choisi pour être converti en marqueur SCAR. Il s'agit du fragment polymorphe de 528 pb amplifié chez la souche Ach 1-1 avec l'amorce OPR-13, et du fragment de 431 pb obtenu spécifiquement dans le profil de la souche 1113-5 par utilisation de l'amorce OPQ-03. Ces deux marqueurs RAPD spécifiques ont été sélectionnés, dans un premier lieu, pour leur forte intensité ainsi que pour leur séquence de courte taille (< 700 pb), ce qui simplifierait les étapes de clonage et de séquençage.

Les deux fragments RAPD choisies ont été découpés du gel d'agarose, clonés et séquencés, puis un ensemble d'amorces SCAR d'une vingtaine de bases ont été synthétisés (cf. Tableau 14). Au total, 13 couples d'amorces ont été testés pour la souche Ach 1-1 (cf. Tableaux 15 et 16) et 12 couples d'amorces ont été testés vis-à-vis de la souche 1113-5 (cf. Tableau 17). Dans le cas de la souche Ach 1-1, parmi tous les couples d'amorces testés, seulement trois couples d'amorces ont permis de générer des marqueurs SCAR spécifiques. Il s'agit d'une bande SCAR de 190 pb générée avec le couple d'amorces AR13.7/AR13.10, un fragment SCAR de 388 pb amplifié avec le couple d'amorces AR13.7/AR13.11 et un marqueur SCAR de 157 pb obtenu avec le couple d'amorces AR13.9/AR13.11. Concernant la souche 1113-5, un marqueur SCAR de 431 pb a été amplifié avec le couple d'amorces AQ3.1/AQ3.2. Les autres couples d'amorces testés ont été rejetés à cause de leur incapacité de générer un fragment unique et spécifique à la souche 1113-5.

Le manque de spécificité de certains couples d'amorces SCAR développés à partir de marqueurs RAPD a été déjà évoqué dans plusieurs travaux de recherche menés sur des agents de biocontrôle tels que : *Beauveria bassiana* (Castrillo et al., 2002), *Pseudomonas fluorescence* souche EPS62e (Pujol et al., 2005) *Candida oleophila* souche O (Massart et al., 2005) et *A. pullulans* souche L47 (Schena et al., 2002).

Dans le présent travail, les paires d'amorces SCAR retenues comme spécifiques à nos deux souches étudiées ont été testées sur 14 souches d'*A. pullulans*, et sur huit souches appartenant à d'autres espèces de levures communément trouvées sur pommes (cf. Tableau 6). Parmi elles, quatre sont déjà utilisées comme agents de biocontrôle en post-récolte : *Pichia anomala* souche K (Jijakli et al., 1999) et souche J121 (Pettersson et Schnürer, 1998), *C. oleophila* souche O (Jijakli et al., 1999) et souche I-128 (Droby et al., 1998).

La spécificité de nos amorces SCAR a été aussi vérifiée en utilisant de l'ADN extrait à partir de la microflore épiphytique de surface des pommes. Aucune amplification n'a été observée.

L'utilisation d'une collection de 15 souches d'*A. pullulans*, y compris les souches ciblées (Ach 1-1 et 1113-5), et huit autres souches isolées à la surface des pommes semble suffisante pour le développement d'amorces SCAR spécifiques aux souches Ach 1-1 et 1113-5. En effet, Massart et al. (2005) ont utilisé 10 souches de *C. oleophila* et 11 souches appartenant à d'autres espèces afin de sélectionner un couple d'amorces SCAR spécifique à la souche O de *C. oleophila*. De Clercq et al. (2003) ont utilisé une collection de 21 souches de *P. anomala* et neuf autres souches comprenant d'autres genres de levures pour sélectionner un couple d'amorce SCAR pour *P. anomala* souche K. Toutefois, afin d'augmenter la spécificité de nos amorces SCAR, il serait intéressant de les tester sur un grand nombre de souches d'*A. pullulans* isolées à partir de différents sites et substrats, ainsi que sur des souches d'*A. pullulans* utilisées comme agents de lutte biologique telles que la souche LS 30 (Lima et al., 1999), la souche L47 (Lima et al., 1997a), la souche CF10 et la souche CF40 (Leibinger et al., 1997).

Dans le futur, il serait intéressant d'exploiter ces marqueurs SCAR relatifs à nos deux souches antagonistes pour le développement d'une technique de PCR en temps réel (PCR quantitative), afin de suivre la dynamique des populations de nos deux souches dans n'importe quel environnement et sous différentes conditions. La PCR en temps réel basée sur des marqueurs SCAR a été déjà utilisée avec succès pour le traçage moléculaire de plusieurs agents de contrôle biologiques tels que *A. pullulans* souche L47 (Scheda et al., 2002), *Plectosphaerella cucumerina* (Atkins et al., 2003), *C. oleophila* souche O (Massart et al., 2005), *P. fluorescens* souche EPS62e (Pujol et al., 2006) et *Trichoderma atroviride* souche T1 (Cordier et al., 2007).

Bien que la technique de PCR en temps réel est plus avantageuse (rapidité, exactitude, sensibilité, analyse en routine) que la PCR conventionnelle, elle exige un travail laborieux avant son développement et des équipements à coût élevé.

4. TRAÇAGE DES SOUCHES ACH 1-1 ET 1113-5 À LA SURFACE DES POMMES EN COURS DE CONSERVATION

La nécessité d'étudier la dynamique des populations des agents de biocontrôle à basses températures est indispensable en post-récolte. En effet, les agents antagonistes utilisés en lutte biologique contre les maladies de post-récolte des fruits, doivent être capables de persister et survivre dans les conditions de conservation de fruits en chambre froide. De plus pour la protection biologique des fruits vis-à-vis des maladies fongiques de post-récolte, le suivi des populations des microorganismes antagonistes revêt une importance particulière au niveau de la procédure d'homologation, puisque ces fruits sont destinés à une consommation directe.

Dans le présent travail de thèse, la partie finale a été consacrée à l'étude de la dynamique des populations des souches antagonistes Ach 1-1 et 1113-5 après application à la surface des pommes Golden Delicious et conservation en chambre froide. Cette étude visait d'une part, à vérifier la capacité de survie, d'adaptation et de colonisation de nos deux souches étudiées sur fruits de pommes, et d'autre part faciliter la procédure d'homologation de nos deux agents de biocontrôle sur le plan des exigences toxicologiques et éco-toxicologiques.

Dans ce contexte, une méthode de traçage mixte (hybride), alliant la simplicité de la technique d'étalement sur un milieu de culture avec la spécificité potentielle d'un marquage moléculaire de la souche ciblée a été développée. Elle consiste à réaliser une quantification des deux souches étudiées par comptage des unités formatrices de colonies (ufc) après récupération des microorganismes à la surface des pommes et étalement sur un milieu de culture semi-sélectif (traçage classique), suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'un marqueur moléculaire (marqueur SCAR) identifiant les ufc qui correspondent à la souche ciblée.

La quantification de nos deux agents antagonistes a été réalisée sur un milieu de culture semi-sélectif noté S₃₂, spécialement développé dans ce travail pour faciliter la détection et le comptage des ufc des souches Ach 1-1 et 1113-5 parmi la microflore épiphytique des pommes. L'identification des ufc se développant sur ce milieu semi-sélectif a été réalisée par amplification PCR à l'aide des couples d'amorces SCAR (AR13.7/AR13.10) et (AQ3.1/AQ13.2) respectivement spécifiques à la souche Ach 1-1 et la souche 1113-5.

Le suivi de l'évolution de la densité des populations (ufc/cm²) de nos deux agents de biocontrôle à la surface des pommes, par utilisation de cette méthode de traçage mixte, a démontré une tendance générale décroissante après deux mois de stockage en chambre froide à une température de 4°C. Cependant, cette densité de population s'est stabilisée vers la fin de la période de conservation des pommes (à partir du 49^{ème} jour) à une valeur moyenne d'à peu près 5x10³ ufc/cm². Ce niveau de population a déjà été trouvé par de nombreux auteurs, et représente un bon taux de survie des agents de biocontrôle à la surface des pommes en condition de stockage à froid. En effet, De Clercq et *al.* (2003) ont étudié la dynamique de population de l'agent antagoniste *Pichia anomala* souche K appliqué sur pommes, et ils ont trouvé un niveau de population de 3x10³ ufc/cm² après une période de stockage des fruits de 2 mois à 4°C. De plus, dans deux autres études menées respectivement par Leibinger et *al.* (1997) et Lima et *al.* (2003) sur des souches d'*A. pullulans* appliquées comme agents de biocontrôle des maladies fongiques de pommes en post-récolte, les densités de populations des souches antagonistes à la surface des pommes présentaient à la fin de la période de conservation en chambre froide, des valeurs allant de 10³ à 10⁴ ufc par cm² de surface de pomme.

Outre, l'allure générale décroissante observée dans cette étude, nous pouvant noter différentes phases de l'évolution du niveau de population des levures Ach 1-1 et 1113-5 à la surface des pommes. Aussi, l'on pourrait remarquer, une phase de décroissance suivie d'une phase de croissance, puis une deuxième phase décroissante (cf. Figure 29). La première phase de décroissance observée pourrait être la conséquence de phénomènes divers tels, l'effet de dilution, l'adsorption des levures à la surface de la pomme et surtout leur adaptation aux nouvelles conditions (Guiraud, 1998). La seconde phase de décroissance pourrait être expliquée par un manque d'énergie suffisante pour le maintien de la population des levures à un niveau plus élevé. En effet, selon le même auteur, la croissance, la survie et le développement d'un microorganisme nécessite la présence d'une source d'énergie.

Notre technique de traçage mixte nous a également permis de montrer que le pourcentage des colonies d'*A. pullulans* identifiées par PCR comme étant la souche Ach 1-1 ou la souche 1113-5 était très important. Il était de 99 % pour la souche Ach 1-1 et de 92 % pour la souche 1113-5. Autrement dit, la population naturelle d'*A. pullulans* à la surface des pommes représentait 1% du nombre d'*A. pullulans* récupérées à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 et 8% dans le cas de la souche 1113-5.

Cette identification moléculaire hautement spécifique de nos deux agents antagonistes, nous a permis d'établir un facteur de correction au comptage des ufc identifiées *a priori* comme souche Ach 1-1 ou souche 1113-5 qui, *a posteriori*, n'ont pas donné d'amplification avec les amorces SCAR spécifiques à chacune de nos deux souches étudiées. Toutefois, cette correction ne semble pas avoir une grande influence sur les résultats des taux de populations obtenu par traçage classique. Néanmoins, l'identification moléculaire des ufc donne à nos résultats beaucoup plus de valeur en terme de spécificité. Les colonies d'*A. pullulans* qui n'ont pas répondu aux amorces SCAR testées, ont été considérées comme souches "contaminantes". Ces souches contaminantes, naturellement présentes à la surface des pommes ne sont pas nécessairement distribuées d'une manière homogène, que se soit en termes de distribution spatiale et/ou temporelle. Cette distribution non homogène pourrait falsifier les études de la dynamique de population d'un agent de biocontrôle si l'identification de la souche cible était exclusivement basée sur des caractéristiques morphologiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

*« Je ne campe pas sur le passé,
j'en tire des conclusions pour le présent »*
[Eric Fisher]

Dans le processus de développement d'une stratégie de lutte biologique basée sur un microorganisme antagoniste, la mise au point d'une méthode de traçage adaptée à cet agent revêt une importance capitale. En effet, l'impact des facteurs environnementaux (température, humidité relative, UV, élément nutritifs, ...) influençant la dispersion et la survie des agents antagonistes ne peut être étudié que si l'on se dote d'outils de traçage permettant de les identifier et les quantifier quelque soit l'environnement dans lequel ils seront introduits. Le traçage permet donc d'estimer l'adaptation et la survie de l'agent de biocontrôle parmi la microflore naturellement présente et d'évaluer l'efficacité des différentes formulations et méthodes d'application de l'agent de lutte biologique en relation avec sa persistance dans l'environnement. Ces études permettent notamment d'améliorer la stabilité et l'efficacité du biopesticide au travers d'un mode de production, d'une formulation et d'une méthode d'application bien adaptés. Outre ces aspects, le traçage constitue une exigence des procédures d'homologation et peut également avoir comme objectif d'identifier la souche d'intérêt afin de protéger son utilisation et sa commercialisation.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail de thèse était de développer une procédure de traçage mixte pour deux agents de biocontrôle *A. pullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5, après leur application en conditions pratiques sur pommes Golden Delicious. Cette procédure consistait en une quantification de nos deux souches étudiées basée sur une technique d'étalement sur un milieu de culture semi-sélectif (milieu S₃₂), suivie d'une identification précise de nos deux souches étudiées par utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques (marqueurs SCAR).

La mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif noté S₃₂ (milieu PDA + 0,5 mg/L d'Euparen + 1 mg/L de Sumico + 1 mg/L de Cycloheximide + 2,5 mg/L d'Hygromycine B + 30 mg/L de Streptomycine sulfate) a permis de détecter et quantifier les populations de nos deux souches de levures antagonistes parmi la microflore épiphytique naturellement présente à la surface de pommes Golden Delicious. En terme de toxicité, ce milieu n'est pas toxique vis-à-vis des souches Ach 1-1 et 1113-5, il permet la survie d'au moins 98% des colonies des deux souches étudiées par rapport au milieu de base PDA (témoin). En terme de sélectivité, notre milieu présente une inhibition totale vis-à-vis de la microflore de l'air, ainsi qu'un effet inhibiteur très important sur la microflore épiphytique des pommes.

Toutefois, notre milieu n'est pas totalement spécifique à l'espèce *A. pullulans*, une autre espèce de levure blanche, provenant des eaux de lavage de pommes Golden Delicious, s'y développe lorsqu'elle est présente. L'élimination de cette levure blanche de notre milieu de culture semi-sélectif ne doit pas nécessairement provenir d'un fongicide. En effet, *A. pullulans* est une levure halotolérante, cette caractéristique pourrait être exploitée afin d'augmenter la spécificité de notre milieu de culture semi-sélectif. À noter aussi que, notre milieu de culture ne permet pas de discriminer chacune de nos deux souches de levures antagonistes.

La littérature montre que seule une analyse génomique permet de distinguer des souches appartenant à la même espèce. Dans cette optique, la technique RAPD a été utilisée pour identifier des marqueurs moléculaires spécifiques pour les souches Ach 1-1 et 1113-5. En testant 99 amorces RAPD (39 pour la souche Ach 1-1 et 60 vis-à-vis de la souche 1113-5), nous avons pu identifier cinq marqueurs RAPD spécifiques à la souche Ach 1-1 et trois marqueurs RAPD spécifiques à la souche 1113-5 (cf. tableaux 11 et 13).

Pour chacune de nos deux souches antagonistes, un marqueur RAPD spécifique a été choisi pour développer un ou plusieurs couples d'amorces PCR permettant une identification spécifique de ces deux souches. Il s'agit d'un fragment RAPD de 528 pb généré spécifiquement dans le profil de la souche Ach 1-1 avec l'amorce RAPD OPR-13, et d'un fragment de 431 pb obtenu spécifiquement dans le profil RAPD de la souche 1113-5 avec l'amorce OPQ-03. Après clonage et séquençage de ces deux marqueurs RAPD, trois couples d'amorces SCAR (AR13.7/AR13.10, AR13.7/AR13.11 et AR13.9/AR13.11) spécifiques à la souche Ach 1-1 et un couple d'amorces SCAR (AQ3.1/AQ3.2) spécifique à la souche 1113-5 ont été identifiés. Les couples d'amorces AR13.7/AR13.10, AR13.7/AR13.11 et AR13.9/AR13.11 génèrent respectivement des fragments SCAR de 190 pb, 388 pb et 157 qui identifient sans ambiguïté la souche Ach 1-1 parmi une collection de 14 souches d'*A. pullulans* et huit autres souches appartenant à d'autres espèces communément isolées de la surface des pommes (cf. figure 27). Alors que, le couple d'amorces AQ3.1/AQ3.2 a permis l'amplification d'une bande SCAR de 431 pb présente uniquement dans le profil de la souche 1113-5 par rapport à la même collection de souches de levures testées dans le cas de la souche Ach 1-1 (cf. figure 28). Toutefois, l'acquisition de nouvelles souches appartenant à l'espèce *A. pullulans* permettrait de renforcer les résultats du marquage moléculaire de nos deux souches cibles.

Une fois ces couples d'amorces SCAR identifiés ainsi qu'un milieu de culture semi-sélectif, une procédure de traçage mixte a été mise au point pour nos deux souches étudiées. Cette technique est basée sur la récupération des microorganismes par trempage des pommes dans un tampon de lavage KPB suivie de l'étalement des eaux de lavage sur le milieu semi-sélectif S₃₂ et l'identification des colonies par amplification PCR des marqueurs moléculaires SCAR de 190 pb et de 431 pb spécifiques aux souches Ach 1-1 et 1113-5 respectivement. Cette technique de traçage mixte nous a permis de montrer que :

1- La population naturelle en *A. pullulans* à la surface des pommes représentait 1% du nombre d'*A. pullulans* récupérées à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 et 8% dans le cas de la souche 1113-5.

2- Le nombre de cellules des souches Ach 1-1 et 1113-5 vivant à la surface du fruit, après 60 jours de conservation à 4°C, a diminué d'environ 58% et 66% respectivement, pour atteindre des niveaux de populations de 6×10^3 ufc/cm² pour la souche Ach 1-1, et 5×10^3 ufc/cm² pour la souche 1113-5.

3- La population des *A. pullulans* présente naturellement à la surface des pommes non traités a totalement disparu au 49^{ème} jour de conservation à 4°C.

La technique de traçage mixte développée dans cette étude nous ouvre des perspectives prometteuses dans le processus de mise au point d'une stratégie de lutte biologique à base de deux levures antagonistes *A. pullulans* souche Ach 1-1 et souche 1113-5. Cette technique de traçage permettra donc une identification précise de nos deux agents antagonistes et une quantification aisée de leurs populations après application dans n'importe quel environnement. Elle permettra également dans le cas éventuel d'application de nos deux agents de biocontrôle en verger, d'étudier l'impact des différents facteurs environnementaux sur le développement et la dispersion de nos deux souches antagonistes. Il s'agit principalement de facteurs de stress abiotiques tels que la température, la disponibilité en eau, l'humidité relative, les longues périodes de sécheresse et/ou de rosé, les rayonnements UV, le pH et la disponibilité des nutriments.

L'introduction à grande échelle de nos deux agents antagonistes requiert aussi l'évaluation de leur impact sur l'environnement, et plus particulièrement leur impact sur la microflore

naturellement présente. Cette introduction à grande échelle exige également d'optimiser les processus de production en masse, de séchage et de formulation de nos deux agents de lutte biologique afin que ceux-ci soient économiquement rentables, qu'ils présentent une durée de vie du produit suffisamment longue et permettent une application aisée par l'arboriculteur. Toutes ces études peuvent être maintenant réalisées, grâce aux outils de traçage développés dans ce travail de thèse.

L'application pratique de nos deux souches de levures antagonistes nécessite aussi la réalisation de tests toxicologiques pour s'assurer de l'innocuité de nos deux levures antagonistes sur la santé du consommateur. Le test toxicologique le plus fréquemment étudié est le test de toxicité aigüe par voie orale sur des rats. Ce test permet de déterminer la dose létale moyenne (DL_{50}) et la dose létale limite (DLL) exprimées en UFC du microorganisme antagoniste par Kg de rat. Dans ce contexte, il était intéressant dans notre cas de connaître le niveau de population de nos deux souches de levures antagonistes en fin de conservation des pommes par rapport au niveau atteint par la même espèce de levure naturellement présente à la surface des pommes non traitées.

Les marqueurs RAPD ainsi que les marqueurs SCAR spécifiques à nos deux souches cibles peuvent aussi être utilisés pour le développement d'un système de contrôle de qualité permettant de surveiller d'éventuelles contaminations (Markovic et Markovic, 1998) ainsi que la stabilité génétique (Becker et Schwinn, 1993) de nos deux souches de levures durant leur production en masse et leur maintien en culture à long terme. Ces marqueurs génétiques trouvent aussi leur importance dans le cas d'une demande de brevet pour nos deux souches antagonistes et aussi dans le cas de constitution d'un dossier d'homologation.

Finalement, la réalisation de toutes ces perspectives, par exploitation des résultats de ce travail de thèse, permettra d'augmenter les chances d'aboutir à un biopesticide commercialisable qui tiendra compte des exigences de l'industriel (seuil de rentabilité économique), de l'arboriculteur (efficacité du produit et facilité de son application) et du consommateur soucieux d'un meilleur respect de sa santé et son environnement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience,
tout le reste n'est que de l'information »*
[Albert Einstein]

A

Abbasi P.A., Miller S.A., Meulia T., Hoitink H.A.J., Kim J.-M. (1999). Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5421–5426.

Achbani E.H., Mounir R., El Jaafari S., Douira A., Benbouazza A., Jijakli M.H. (2005). Selection of antagonists of postharvest apple parasites: *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Commun. Appl. Biol. Sci., Ghent University.* 70, 143–149.

Ajello L., (1977). The black yeasts as disease agents: historical perspective. *PAHO* 324, 9–16.

Alvindia D. G. and Natsuaki K. T. (2008). Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection.* 27(8), 1200–1207.

Aloi C., Benzi D., Testoni A., Gullino M.L., (1991). Biological control of postharvest diseases of apple: experimental results. In: ANPP-Third International Conference on Plant Diseases, Tome II. Ed. Ministère de l'agriculture et ministère de la recherche et de la Technologie, Bordeaux. 695–702.

Arnaud G., (1910). Contribution a l'étude des Fumagines. *Ann. Mycol.* 8, 470–476.

Atkins S.D., Clark I.M., Sosnowska D., Hirsch P.R., Kerry B.R. (2003). Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4788–4793.

Atkins S. D., Clark I. M., Pande S., Hirsch P. R. and Kerry B. R. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Ecol.* 51, 257–264.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.E., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., (1987). Preparation of yeast DNA. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.E., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2. John Wiley, New York, USA.

B

Bae Y. S. and Knudsen G. R. (2000). Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with beta-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 810–815.

Bastiaanse H., De Lapeyre de Bellaire L., Lassois L., Misson C., Jijakli M.H. (2010). Integrated control of crown rot of banana with *Candida oleophila* strain O, calcium chloride and modified atmosphere packaging. *Biological control.* 53 (1), 100–107.

Becker J.O. and Schwinn F.J. (1993). Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37, 355–363.

Bencheqroun S. K., Bajji M., Massart S., Bentata F., Labhilili M., Achbani E.H., El Jaafari S., Jijakli M.H. (2006). Biocontrol of blue mold on apple fruits by *Aureobasidium pullulans* (strain Ach 1-1): *In vitro* and *in situ* evidence for the possible involvement of competition for nutrients. *Commun. Appl. Biol. Sci., Ghent University.* 71, 1151–1157.

Bencheqroun S.K., Bajji M., Massart S., Labhilili M., El Jaafari S., 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.

Bélangier R.R., Dufour N., Caron J., Benhamou N., (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology*. 5, 41–43.

Björklöf K. and Jorgensen K.S. (2001). Applicability of non-antibiotic resistance marker genes in ecological studies of introduced bacteria in forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 38, 179–188.

Bondoux P. (1992). Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires. Ed. INRA et PHM, Paris – France.

Bostock A., khattak M.N., Matthews R., burnie J. (1993). Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal of general microbiology*. 139, 2179–2184.

Botstein D., White R.L., Skolnick M., Dvies R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314–331.

Bowen J.K., Crowhurst R.N., Templeton M.D., Stewart A. (1996). Molecular markers for a *Trichoderma harzianum* biological control agent: Introduction of the hygromycin B resistance gene and the betaglucuronidase gene by transformation. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*. 24, 219–228.

Bryk H., Sobiczewski P., Berczynski S. (1999). Evaluation of protective activity of epiphytic bacteria against gray mold (*Botrytis cinerea*) and blue mold (*Penicillium expansum*) on apples. *Phytopatologia Polonica* : 18: 69-79

Buhagiar, R.W.M., Barnett, J.A., (1971). The yeasts of strawberries. *J. Appl. Bact.* 34, 727–739.

Bull C.T., Stack J.P., Smilanick J.L., (1997). *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biol.Control*. 8, 81–88.

Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25, 169–193.

C

Calvente V., Benuzzi D., de Tosetti M.I.S. (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.* 43, 167–172.

Carleg F. and Olson M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82, 3756–3760.

Castoria R., De Curtis F., Lima G., De Cicco V., (1997). β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action against postharvest diseases. *Postharvest Biol. Technol.* 12, 293–300.

Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., De Cicco V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 22, 7–17

Castrillo L.A., Vandenberg J.D., Wraight S.P. (2002). Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence characterized amplified region markers. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82, 75–83.

Cañamás T.P., Viñas I., Usall J., Casals C., Solsona C., Teixidó N. (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 49(1), 86-95.

Chalutz E. and Droby S. (1993). Mechanism of antagonisms of yeasts postharvest disease. In : Biological control of fruit and foliar disease (Lepoivre P., eds). Proceedings of an EC workshop, Gembloux. 67–76.

Chapon A., Boutm M., Rime D., Guillerm A.Y., Delalande I., Sarniguet A. (2000). Assessing wheat root colonisation by a *Pseudomonas fluorescens* strain with direct PCR quantification. In: Methods to monitor microbial inoculants to improve their succes. Book of abstracts. International workshop (COST). 6-8 April. Editor Postma J. Wageningen, The Netherlands. Page 18.

Chand-Goyal T. and Spotts R.A. (1997). Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control.* 10, 199–206.

Chand-Goyal T., Eckert J.W., Droby S., Atkinson K. (1998). A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on oranges in the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. *Microbiol. Res.* 153, 265–270.

Chen C., Zhang W., Gao W., Chen W., Li A., Zhang Y., Liu H., Zhang L. (2010). Using a sequence characterized amplified region (SCAR) marker for detection of *Bacillus* strain TS02 sprayed on strawberry plants to bio-control powdery mildew in fields. *African Journal of Biotechnology.* 9(37), 6049-6055.

Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 793-804.

Choi H.Y., Ryder M.H., Gillings M.R., Stokes H.W., Ophel-Keller K.M., Veal D.A. (2003). Survival of a lacZY-marked strain of *Pseudomonas corrugates* following a field release. *FEMS Microbiol Ecol.* 43, 367–374.

Cognet S. and Jijakli M.H. (2000). Contribution à la mise au point d'une méthode de traçage de l'agent de biocontrôle *Pichia anomala* souche K basée sur la PCR-ELOSA quantitative compétitive. Travail de fin d'études (DEA). Gembloux – Belgique

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

Cooley D.R., Wilcox W.F., Kovach J., Schloemann S.G. (1996). Integrated pest management programs for strawberries in the northeastern United States. *Plant. Dis.* 80, 228 – 237.

Cordier, C., Edel-Hermann V., Martin L., Blal B., Steiberg C., Alabouvette C. (2007). SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *J. Microbiol. Methods.* 68, 60–68.

Corbaz R. (1990). Principe de phytopathologie. Presses polytechniques et Universitaires Romandes. XVII, 286 p.

Coste D.M.de and Subasinghe SSNS. (1999). Antagonistic bacteria associated with the fruit skin of banana in controlling its postharvest diseases. *Tropical Science.* 38, 206 – 212.

Creemers P. (1998). Lutte contre les maladies de conservation : situation actuelle et perspectives nouvelles. *Le fruit belge.* 44, 37 – 49.

Cross N.C.P. (1995). Quantitative PCR techniques and applications. *British journal of haematology.* 89, 693 – 697.

D

Dauch A.L., Watson A.K., Jabaji-Hare S.H. (2003). Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. *J. Microbiol. Methods.* 55, 51–64.

- De Arruda M.C.C., Miller R.N.G., Ferreira M.A.S.V., Felipe M.S.S. (2003).** Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology*. 52, 236–244
- De Bary, (1866).** *Dematium pullulans*. *Morphol. Physiol. Pilze* 182 p.
- De Clercq D., Cognet S., Pujol M., Lepoivre P., Jijakli M. H. (2003).** Development of a SCAR marker and semi-selective medium for specific quantification of *Pichia anomala* strain K on apple fruit surfaces. *Postharvest biology and technology*. 29, 237–247.
- De Curtis F., Caputo L., Castoria R., Lima G., Stea G., De Cicco V. (2004).** Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) to identify specific molecular markers for the biocontrol agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30. *Postharvest Biol. Technol.* 34, 179–186.
- De Hoog G.S. (1993).** Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63, 105–109.
- De Hoog G.S. and Yurlova N.A. (1994).** Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 65, 41–54.
- De Hoog G.S. (2000).** Atlas of clinical fungi, ed. 2 : 1-1126.
- De Vos M.M. and Nelis H.J. (2006).** An improved method for the selective detection of fungi in hospital waters by solid phase cytometry. *J. Microbiol. Methods*. 67, 557–565.
- Divol B. and Lonvaud-Funel A. (2005).** Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 85 – 93.
- Dodd S.L., Hill R.A., Stewart A. (2004).** A duplex-PCR bioassay to detect a *Trichoderma virens* biocontrol isolate in non-sterile soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 36, 1955–1965.
- Domsh K.H., Gaams W., Anderson T.H. (1980).** In: Compendium of Soil Fungi, Academic Press, London. 130–134.
- Donegan K., Matyac C., Seidler R., Porteous A. (1991).** Evaluation of methods for sampling, recovery, and enumeration of bacteria applied to the phylloplane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 51–56.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C.L. (1991).** Antagonistic microorganisms as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Postharvest News and Information*. 2, 169–173.
- Droby S. and Chalutz E. (1994).** Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases – Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 63–75.
- Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren-Tzur M., Shachnai A. (1998).** Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control*. 12, 97–101.
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C. (2009).** Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52, 137–145.

E

- Eckert J.W. and Ogawa J.M. (1985).** The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Ann.Rev. Phytopathol.* 23, 421–454.

Eckert J.W. and Ogawa J.M. (1988). The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 433–446.

Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G., Alabouvette C. (1995). Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology.* 85, 579–85.

Elad Y., Chet I., Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica.* 9, 59–67.

Elad Y., Kohl J., Fokkema N.J. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 100, 315–336.

Elad Y., Malathrakis N.E., Dik A.J. (1996). Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection.* 15, 229–240.

El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M. (1998). Ultra-structural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology.* 88, 282–291.

El-Neshawy S. and Shetaia Y.M.H. (2003). Biocontrol capability of *Candida* spp. against *Botrytis* rot of strawberries with respect to fruit quality. *Ishs acta horticulturae.* 604, 727–733.

Errampalli D., Nichole R., Brubacher. (2006). Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biological Control.* 36(1), 49-56.

F

Fan Q., Tian S.P., Li Y.X., Wang Y., Xu Y., Li J.D. (2000). Postharvest biological control of green mold and blue mold of citrus fruits by *Bacillus subtilis*. *Acta Phytopathologica Sinica.* 30, 343–348.

Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture (FAO) (2007). Base de données statistiques (www.fao.org).

Ferre F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. *PCR Methods Appl.* 2, 1–9.

Filonow A.B. (1998). Role of competition for sugars by yeasts in the biological of gray mold and blue mold of apple. *Biocontrol Sci. Technol.* 8, 243–256.

Fokkema N.J. (1973). The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiol. Plant Pathol.* 3, 195–205.

Fokkema N.J. (1991). The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: a plant pathologist's point of view. In: *Microbial Ecology of Leaves*, (Andrews J. H. and Hirano S. S., eds). Ed Springer-Verlag, Madison. 3–18.

Francllet J. (1994). Enquête ANPP-Maladies de conservation des pommes. *Arboric. Fruit.* 473, 24–26.

G

Gaur R., Singh R., Gupta M., Gaur M. K. (2010). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology.* 9(47), 7989-7997.

Green H. and Jensen D.F. (1996). Monitoring of a *gus* transformed strain of *Trichoderma harzianum* in soil and rhizosphere. In: *Monitoring Antagonistic fungi Deliberately released into the Environment*. D. F. Jensen et al. (eds.). *Kluwer Academic Publishers*. The Netherlands. Page 73–83.

Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M. D., Mateos P.F., Bridge P.D., Monte E., Garcia-Acha I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Env. Microbiol.* 63 (8), 3189–3198.

H

Hamill R.J., Houston E.D., Georghiou P.R., Wright C.E., Koza M.A., Cadle R.M., Goepfert P.A., Lewis D.A., Zenon G.J., Clarridge J.E. (1995). An outbreak of *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) *cepacia* respiratory tract colonization and infection associated with nebulized albuterol therapy. *Ann. Intern. Med.* 122, 762–766.

Hermanides-Nijhof E.J. (1977). *Aureobasidium* and allied genera. In: The Black Yeasts and Allied Hyphomycetes. Studies in Mycology. Ceentralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. pp. 141–177.

Hermosa M.R., Grondona I., Diaz-Minguez J.M., Iturriaga E.A., Monte E. (2001). Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr. Genet.* 38, 343–350.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S. and Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *BioTechnology.* 10: 413–417.

Holmes G.J. and Eckert J.W. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology.* 89, 716–721.

Higgins C.F., Ames G.F., Barnes W.M., Clement J.M., Hofnung M. (1982). A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature.* 298, 760–762.

Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. (1991). ERIC sequence: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology.* 5, 825–34.

Heiberg N., Green H., Jensen D.F. (1996). Population growths and survival of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* in sphagnum peat. In: Monitoring Antagonistic Fungi Deliberately Released into the Environment. Eds. D.F. Jensen H-B. Jansson and A. Tronsmo. *Kluwer Academic Publishers.* Pages 25–31.

I

Ippolito A., Nigro F., Romanazzi G., Campanella V. (1997). Field application of *Aureobasidium pullulans* against *Botrytis* storage rot of strawberries. Proceedings of the Cost 914–915 ‘Non conventional methods for the control of postharvest disease and microbiological spoilage’, Bologna, Italy, October 9–11, 127–133.

Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M. (2000). Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology.* 19, 265–272.

Ippolito A. and Nigro F. (2000). Impact of preharvest application of biocontrol agents on postharvest rots of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection.* 19, 715–723

Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F. (2005). Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. Technol.* 36, 245–252.

J

- Janisiewicz W. J. (1987):** Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology*. 77, 481–485.
- Janisiewicz W. J. (1988):** Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology*. 78, 194–198.
- Janisiewicz W.J., Roitman J. (1988).** Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 78, 1697–1700.
- Janisiewicz W.J., Peterson D.L., Bors B. (1994).** Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Dis.* 78, 1103–1110.
- Janisiewicz W.J. and Bors B. (1995).** Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound—invading postharvest pathogens of fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3261–3267.
- Janisiewicz W.J. (1996).** Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used developing mixture for biocontrol of postharvest disease of apple. *Phytopathology*. 86, 473–479.
- Janisiewicz W.J. and Jeffers S.N. (1997).** Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop. Prot.* 16, 629–633.
- Janisiewicz W.J. (1998).** Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits: challenges and opportunities. In: Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (Eds.), *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 171–198.
- Janisiewicz W.J., Tworowski T.J., Sharer C. (2000).** Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*. 90 (11), 1196–1200.
- Janisiewicz W.J., Korsten L. (2002).** Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 411–441.
- Jedryczka M., Rouxel T., Balesdent M.H. (1999).** Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 105, 813–823.
- Jijakli M.H., Lepoivre P., Tossut P., Thonard P. (1993).** Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. 58/3b, 1349–1358.
- Jijakli M.H. and Lepoivre P. (1993).** Biological control of postharvest *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on apples. In: Fokkema, N.J., Köhl, J., Elad, Y. (Eds.), *Biological Control of Foliar and Post-Harvest Diseases*. IOBC/WPRS Bull. 16, 106–110.
- Jijakli M.H. et Lepoivre P. (1995).** Utilisation de biopesticides pour la protection des pommes en conservation. *Le fruits Belge*. 445, 83–88.
- Jijakli M.H. (1996).** Etudes des propriétés antagonistes de deux souches de levures vis-à-vis de *Botrytis cinerea* pers. sur pommes en conservation. Thèse de doctorat, Gembloux, FUSA, Belgique.
- Jijakli M.H. and Lepoivre P. (1998).** Characterization of an exo- β -glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*. 88, 335–343.
- Jijakli M.H., Lepoivre P., Grevesse C. (1999).** Yeast species for biocontrol of apple postharvest diseases: an encouraging case of study for practical use. In: Mukerij K. G., Chamola B.P., Upadhyay, R.K. (Eds), *Biotechnological Approches in Biocontrol of Plant Pathogens*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, pp. 31–49.
- Jijakli M.H. (2000).** Maladies de conservation de la pomme : lutte biologique au moyen de deux souches de levures. *L'arboriculture fruitière*. 539, 19–23.

Jijakli M.H. (2001). La lutte biologique : alternative utopique ou réaliste à l'emploi des pesticides chimiques ? *Les presses agronomiques de Gembloux*.

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

Jijakli M.H. (2010). *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99 (1), 93-105.

Jones A.L. and Aldwinckle H.S., eds. (1991). Compendium of Apple and Pear Diseases. *The American Phytopathological Society, St. Paul, MN*.

K

Karabulut O.A. and Baykal N. (2003). Biological control of postharvest disease of peaches and nectarine by yeast. *Phytopathology*. 151, 130–134.

Köhl J., Molhoek W.M.L., van der Plas C.H., Fokkema N.J. (1995). Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology*. 85, 393–401.

Kunz S. (2004). Development of “Blossom-Protect” – a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. In 11th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture. ed. Boos, M. pp. 108–114.

Kunz S. and Haug P. (2006). Development of a strategy for fire blight control in organic fruit growing. In 12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing ed. Boos, M. pp. 113–117.

L

Landa B.B., Mavrodi O.V., Raaijmakers J.M., McSpadden Gardener B.B., Thomashow L.S., Weller D.M. (2002). Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3226–3237.

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

Lee J.W., Yeomans W.G., Allen A.L., Deng F., Gross R.A., Kaplan D.L. (1999). Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5265–5271.

Li S., Cullen D., Hjort M., Spear R., Andrews J.H. (1996). Development of an oligonucleotide probe for *Aureobasidium pullulans* Based on the small-subunit rRNA gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1514–1518.

Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. (1997a). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 169–178.

Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V. (1997b). Integrated control of postharvest diseases of ‘Annurca’ apples by pre-storage application of yeasts and benomyl. In: Bertolini, P., Sijmons, P.C., Guerzoni, M.E., Serra, F. (Eds.), Proceedings of the joint COST 914–915 workshop Non Conventional Methods for the Control of Postharvest Diseases and Microbiological Spoilage, 9–11 October 1997, Bologna, Italy, pp. 121–126.

Lima G., Arru S., De Curtis F., Arras G. (1999). Influence of antagonist, host fruit, and pathogen on the control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Ind. Microbiol. Biotech.* 23, 223–229.

Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V. (2003). Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 341–349.

Lima, G., Spina, A.M., Castoria, R., De Curtis, F., De Cicco, V. (2005). Integration of biocontrol agents and food-grade additives for enhancing protection of stored apples from *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*. 68 (10), 2100-2106.

Lima G., De Curtis F., Piedimonte D., Spina A.M., De Cicco V. (2006). Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*. 40 (3), 301-307.

Loncaric I., Donat C., Antlinger B., Oberlerchner J.T., Heissenberger B., Moosbeckhofer R. (2008). Strain-specific detection of two *Aureobasidium pullulans* strains, fungal biocontrol agents of fire blight by new, developed multiplex-PCR. *Appl. Microbiol.* 104, 1433–1441.

Lowder M., Unge A., Maraha N., Jansson J.K., Swiggett J., Oliver J.D. (2000). Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP - tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3160–3165.

M

Magan N. (2001). Physiological Approches to Improving the Ecological Fitness of Fungal Biocontrol Agents. Fungi as Biocontrol Agents. Progress, problems and Potential. *CABI Publishing, Bristol*. 390 p.

Markovic O. and Markovic N. (1998). Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 1–8.

Maouni A., Lamarti A., Douira A., Badoc A. (2002). Étude de la résistance d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum* aux fongicides lors de la conservation des poires. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 141, 61–72.

Martell M. Gomez J., Esteban J.I., Sauleda S., Quer J., Cabot B., Esteban R., Guardia J. (1999). High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 327–332.

Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenberck R., Morrison D.A., Boulnois G.J., Claverys J.P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*. 20, 3479–3483.

Massart S., De Clercq D., Salmon M., Dickburt C., Jijakli M.H. (2005). Development of real-time PCR using minor groove binding probe to monitor the biological control agent *Candida oleophila* (strain O). *Microbiol. Methods*. 60, 73–82.

Matteson M.C., Corral-Garcia M.R., Momol E.A., Burr T.J. (1997). Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Dis.* 81, 337–342.

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

McLaughlin R.J., Wilson C.L., Droby S., CHALUTZ E. (1992). Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant disease*. 76, 470–473

McSpadden-Gardener B.B., Schroeder K.L., Kalloger S.E., Raaijmakers J.M., Thomashow L.S., Weller D.M. (2000). Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1939–1946.

Mehdid Y., Jijakli M.H., Lepoivre P. (1998). Étude de marquage moléculaire de *Pichia anomala* souche K par la technique RAPD. Travail de fin d'études (DEA). Gembloux – Belgique.

Mehrotra N.K., Sharma N., Nigam M., Ghosh R. (1998). Biological control of sour rot of citrus fruits by yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. India.* 68, 133–139.

Mikani A., Etebarian H.R., Sholberg P.L., O’Gorman D.T., Stokes S., Alizadeh A. (2008). Biological control of apple grey mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology.* 48(1), 107-112.

Ministère De l’Agriculture, Du Développement Rural Et Des Pêches Maritimes (MADRPM) (2007). La production des rosacées fruitières au Maroc.

Montesinos E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6, 245–252.

Morales H., Sanchis V., Usall J., Ramos A.J., Marin S. (2008). Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology.* 122(1-2), 61-67.

Mounir R., Durieux A., Bodo E., Allard C., Simon J-P., Achbani E.H., El Jaafari S., Douira A., Jijakli M.H. (2007). Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnol. Lett.* 29, 553–559.

N

Nakayama H., Yokoi H., Fujita J. (1992). Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Nucleic Acids Research.* 20, 4939.

Nuclo R.L., Johnson K.B., Stockwell V.O., Sugar D. (1998). Secondary colonization of pear blossoms by two bacterial antagonists of the fire blight pathogen. *Plant Dis.* 82, 661–668.

Nunes C., Bajji M., Stepien V., Manso T., Torres R., Usall J., Jijakli M.H. (2008). Development and application of a SCAR marker to monitor and quantify populations of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 422–428.

Nunes C., Usall J., Teixidó N., Fons E., Viñas I. (2002). Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on golden delicious apples. *Appl. Microbiol.* 92, 247–255.

O

Olive D.M. and Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology.* 37, 1661–1669.

P

Paavanen-Huhtala S., Avikainen H., Yli-Mattila T. (2000). Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 187–198.

Paran I. and Michelmore R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85, 985–993.

Peccoud J. (1993). La PCR quantitative : un nouvel outil pour l’analyse médicale. *Médecine/Sciences.* 9, 1378–1385.

Petersson S. and Schnürer J. (1998). *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. *Can. J. Microbiol.* 44, 471–476.

Piatak M., Ka-Cheung L., Williams B., Lifson J.D. (1993). Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques.* 14 (1), 70–77.

Poitras E. et Houde A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology.* 2 (2), 2–11.

Pujol M., Badosa E., Manceau C., Montesinos E. (2006). Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and real-time PCR methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2421–2427.

Pujol M., Badosa E., Cabrefiga J., Montesinos E. (2005). Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. *Microbiol. Lett.* 249, 343–352.

Pujol M. et Jijakli M.H. (2001). Optimisation de la PCR-ELISA quantitative, méthode de traçage de *Pichia anomala* souche k. Travail de fin d'études (DEA). Gembloux – Belgique.

Pusey P.L. and Wilson C.L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant disease.* 68(9), 753–756.

R

Rezzonico F., Moëgne-Loccoz Y., Défago G. (2003). Effect of stress on the ability of a phlA-based quantitative competitive PCR assay to monitor biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 686–690.

Roberts R.G. (1990). Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology.* 80, 526–529.

Rodov V., Ben-Yehoshua S., Albaglis R., Fang D. (1994). Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. Proceedings of International Scientific Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, Freising weihenstephan, Germany, September 1993, *Acta Hort.* 381, 517–523.

Rozen S. and Skaletsky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386.

Rubio M.B., Hermosa M.R., Keck E., Monte E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microb. Ecol.* 49, 25–33.

S

Saravanakumar D., Ciavorella A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology.* 49(1), 121–128.

Savazzini F., Longa C.M.O., Pertot I., Gessler C. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *J. of Microbiological Methods.* 73, 185–194.

- Savelkoul P.H.M., Aarts H.J.M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rodmaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J.A. (1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 3083–3091.
- Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F., Droby S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol. Technol.* 17, 189–199.
- Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Droby S. (2000). Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeasts. *European journal of plant pathology*. 106, 681–691.
- Schena L., Sialer M.F., Gallitelli D. (2002). Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Dis.* 86, 54–60.
- Schena L., Nigro N., Pentimone I., Ligorio A., Ippolito A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 209–220.
- Scherm B., Ortu G., Muzzu A., Budroni M., Arras G., Migheli Q. (2003). Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology*. 85 (3), 205–213.
- Sholberg P.L., Harlton C., Haag P., Lévesque C.A., O’Gorman D., Seifert K. (2005). Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using β -tubulin gene sequences. *Postharvest biol. technol.* 36, 41–49.
- Schwartz D.C. and Cantor C.R. (1984). Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37, 67–75.
- Seibold A., Fried A., Kunz S., Moltmann E., Lange E., Jelkmann W. (2004). Yeasts as antagonists against fireblight. *EPPO Bull.* 34, 389–390.
- Sessith A., Hradarson G., de Vos W.M., Wilson K.J. (2000). Use of genes marker in competition studies of *Rhizobium*. In : Methods to monitor microbial inoculants to improve their success. Book of abstract. International workshop (COST). 6-8 April. Editor Postma J. Wageningen, The Netherlands. Page 3.
- Smilanick J.L., Denis-Arrue R., Bosch J.G., Gonzalez A.R., Henson D., Janisiewicz W.J. (1993). Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Protection*. 12, 513–520.
- Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M.L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 123–134.
- Spadaro D. and Gullino M.L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. 91, 185–194.
- Spadaro D., Sabetta W., Acquadro A., Portis E., Garibaldi A., Gullino M.L. (2008). Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. *Microbiological Research*. 163 (5), 523-530.
- Spadaro D. And Gullino M.L. (2010). Opportunities and constraints in the development of antagonistic yeasts for the control of postharvest diseases of fruit. *Stewart Postharvest Review*. 6(3), 1-8.
- Spotts R.A., Cervantes L.K. (1986). Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis.* 70, 106–108.
- Sterflinger K. (2005). Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: Rosa, C., Gabor, P. (Eds.), *The Yeast Handbook vol. 1: Biodiversity and Identification of Yeasts*. Springer, New York, pp. 505–518.

T

Teixidó N., Usall J., Vinas I. (1999). Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mold on apples during cold storage. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 203–210.

Teixidó N., Usall J., Palou L., Asensio A., Nunes C., Viñas I. (2001). Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 685–694.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673 – 4680.

Tombolini R., Unge A., Davey M.E., de Bruijn F.J., Jansson J.K. (1997). Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 22, 17–28.

U

Unge A., Tombolini R., Molbak L., Jansson J.K. (1999). Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 813–821.

Urzi C., De Leo F., Lo Passo C., Criseo G. (1999). Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods.* 36, 95–105.

Usall J., Teixidó N., Fons E., Viñas I. (2000). Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology.* 58 (1-2), 83–92.

Usall J., Teixidó N., Torres R., de Eribe X.O., Vinas I. (2001). Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 21, 147–156.

V

Van Belkum A., De Jonckheere J., Quint W.G.V. (1993). Typing *Legionella pneumophila* strains by polymerase chain reaction-mediated fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2198–2200.

Van Elsas J.D., Duarte G.F., Rosado A.S., Smalla K. (1998) Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Methods.* 32, 133–154.

Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acid. Res.* 19, 6823–6831.

Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5, 25–40.

Viala P. et Boyer G. (1891). Sur un Basidiomycète inférieur, parasite des grains de raisins. *C.r. hebd. Seanc. Acad. Sci.*, Paris. 112, 1148–1150.

Viñas I., Usall J., Teixidó N., Sanchis V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology.* 40 (1-2), 9–16.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids Res.* 23, 4407–4414.

W

Webb T.A. and Mundt J.O. (1978). Mold on vegetables at the time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 4, 655–658.

Wellings P.W. (1996). The role of public policy in biological control: some global trends. *Entomophaga.* 41, 435–441.

William S.C., Janisiewicz, W. J. Leverentz B., Saftner R. A., Camp. M. J. (2007). Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture, and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology.* 4(3), 326-332.

Williams J.G.K., kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefeul as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18 (22), 6531–6535.

Wilson C.L. and Wisniewsky M.E. (1989). Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables. An emerging technology. *Annual Review phyopathology.* 27, 425–441.

Wilson C.L. and Wisniewski M.E. (1994). Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 182.

Wisniewski M.E., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C., Chalutz E. (1991). Mode of the postharvest biological yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 245–258.

X

Xiao C.L. (2005). Postharvest Diseases of Apples and Pears: A Guide to Diagnosis and Control. (www.decay.tfrec.wsu.edu).

Xufre A., Simões F., Gírio F., Clemente A., Amaral-Collaço M.T. (2000). Use of RAPD Analysis for Differentiation among Six Enological *Saccharomyces* spp. Strains. *Food technol. Biotechnol.* 38 (1), 53–58.

Y

Yu T., Chen J., Chen R., Huang B., Liu D., Zheng X. (2007). Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. *International Journal of Food Microbiology.* 116(3), 339-345.

Yu T., Wang L., Yin Y., Wang Y. and Zheng X. (2008). Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology.* 122(1-2), 29, 44-48.

Yurlova N.A., Mokrousov I.V., de Hoog G.S. (1995). Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Ant. Van Leeuwenhoek.* 68, 57–63.

Yurlova N.A. and de Hoog G.S. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek.* 72, 141–147.

Yurlova N.A., de Hoog G.S., Gerrits van den Ende A.H.G. (1999). Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Stud. Mycol.* 43, 63–69.

Z

Zahavi T., Cohen L., Weiss B., Schena L., Daus A., Kaplunov T., Zutkhi J., Ben-Arie R., Droby S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 115–124.

Zalar P., Gostincar C., de Hoog G.S., Ursic V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology.* 61, 21–38.

Zammatteo N., Moris P., Alexandre I., Vaira D., Piette J., Remarque J. (1995). DNA probe hybridization in microwells using a new bioluminescent system for the detection of PCR-amplified HIV-1 proviral DNA. *Journal of Virological Methods.* 55, 185–197.

Zhang H., Wang L., Dong Y., Jiang S., Cao J., Meng R. (2007). Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control.* 40 (2), 287-292.

Zhang L., Liu X., Zhu S., Chen S. (2006). Detection of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in soil by real-time PCR and parasitism bioassay. *Biol Control.* 36, 316–323.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2), 203-14.

Zhao Y., Tu K., Shao X., Jing W., Su Z. (2008). Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 49(1), 113-120.

Zimmermann K. and Mannhalter J.W. (1996). Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques.* 21(2), 268–279.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques des fongicides et antibiotiques testés

Produit	Nom commercial	Famille (Matière active)	Mode d'action	Spectre d'action
Fongicide	Sumico	Benzimidazole Phénylcarbamate (25% de carbendazime et 25% de diéthofencarbe)	Antimitotique systémique	Maladies de conservation (<i>Gleospodium</i> , <i>Botrytis</i> ...)
	Fungaflor	Imidazole (imazalil)	Inhibiteur de la synthèse d'ergostérol Systémique	<i>Botrytis</i> et <i>Penicillium</i>
	Lirotect	Benzimidazole (thiabendazole)	Antimitotique, systémique	<i>Penicillium</i> , <i>Gleospodium</i> , <i>Botrytis</i>
	Captane	Phtalimide (captan)	Multisite, non systemique : inhibiteurs de la respiration	Tavelure, <i>Monilia</i> , <i>Botrytis</i> (<i>Penicillium</i>)
	TMTD	Dithiocarbamate (Thiram)	Multisite, non systemique : inhibiteurs de la respiration	Tavelure, <i>Gleospodium</i> , <i>Monilia</i> , <i>Botrytis</i>
	Topsin	Benzimidazole (thiophanate-méthyl)	Antimitotique, systémique	Tavelure et maladies de conservation
	Pelt 44	Benzimidazole (70% thiophanate-méthyl)	Antimitotique, systémique	Tavelure et maladies de conservation
	Euparen	Sulfamide (tolylfluanide)	Multisite	Tavelure, <i>Gleospodium</i> , <i>Botrytis</i> (<i>Penicillium</i>)
Antibiotique	Cycloheximide	Cycloheximide (Cycloheximide)	Inhibiteur du transfert des acides aminés	Cellules eucaryotes
	Généticine	Aminoglycoside (Généticine)	bloque la synthèse des protéines	Cellules eucaryotes
	Hygromycine B	Aminoglycoside (Hygromycine B)	Inhibiteur de la synthèse des protéines	Bactéries et champignons
	Tétracycline	Cyclines (Tétracycline)	Empêche la fixation de l' aminoacyl- ARNT	Bactéries
	Spectinomycine	Aminoglycosides (Spectinomycine)	Inhibe la translocation du t- ARN peptidyl	Bactéries
	Streptomycine sulfate	Aminoglycosides (Streptomycine)	Inhibiteur de la synthèse des protéines	Bactéries

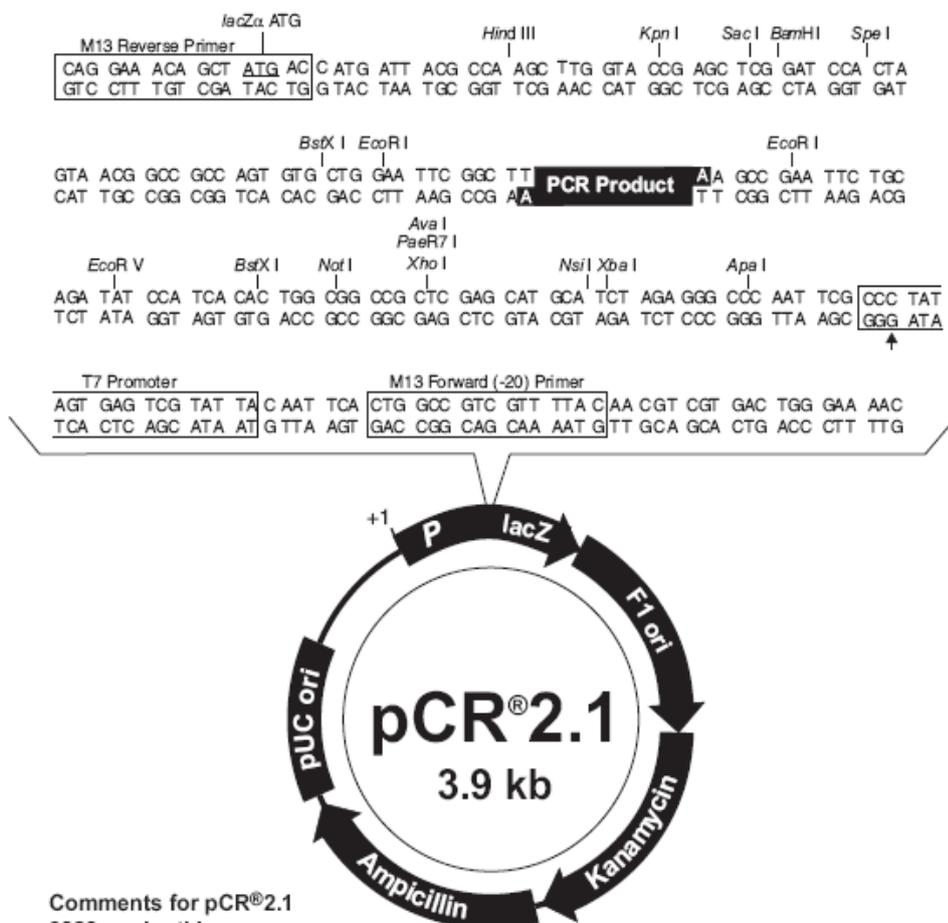
Annexe 2 : Séquence et code des amorces RAPD testées (OPERON Technologies, Inc, USA)

KIT et codes	Séquences	KIT et codes	Séquences
KIT K		KIT Q	
OPK-01 ^b	5'-CATTTCGAGCC-3'	OPQ-03 ^b	5'-GGTCACCTCA-3'
OPK-02 ^b	5'-GTCTCCGCAA-3'	OPQ-04 ^a	5'-AGTGCGCTGA-3'
OPK-05 ^b	5'-TCTGTCTGAGG-3'	OPQ-10 ^b	5'-TGTGCCCGAA-3'
OPK-12 ^b	5'-TGGCCCTCAC-3'	OPQ-12 ^{a,b}	5'-AGTAGGGCAC-3'
OPK-13 ^{a,b}	5'-GGTTGTACCC-3'	OPQ-15 ^a	5'-GGGTAACGTG-3'
OPK-17 ^b	5'-CCCAGCTGTG-3'	OPQ-19 ^b	5'-CCCCCTATCA-3'
OPK-18 ^{a,b}	5'-CCTAGTCGAG-3'	OPQ-20 ^a	5'-TCGCCCAGTC-3'
KIT L		KIT R	
OPL-02 ^b	5'-TGGGCGTCAA-3'	OPR-03 ^a	5'-ACACAGAGGG-3'
OPL-07 ^b	5'-AGGCGGGAAC-3'	OPR-05 ^a	5'-GACCTAGTGG-3'
OPL-10 ^b	5'-TGGGAGATGG-3'	OPR-06 ^a	5'-GTCTACGGCA-3'
OPL-13 ^b	5'-ACCGCCTGCT-3'	OPR-07 ^b	5'-ACTGGCCTGA-3'
KIT M		KIT S	
OPM-01 ^{a,b}	5'-GTTGGTGGCT-3'	OPS-01 ^{a,b}	5'-CTACTGCGCT-3'
OPM-03 ^{a,b}	5'-GGGGGATGAG-3'	OPS-05 ^{a,b}	5'-TTTGGGGCCT-3'
OPM-04 ^b	5'-GGCGGTTGTC-3'	OPS-06 ^{a,b}	5'-GATACCTCGG-3'
OPM-06 ^b	5'-CTGGGCAACT-3'	OPS-07 ^b	5'-TCCGATGCTG-3'
OPM-08 ^{a,b}	5'-TCTGTTCCCC-3'	OPS-08 ^b	5'-TTCAGGGTGG-3'
OPM-09 ^{a,b}	5'-GTCTTGCGGA-3'	OPS-11 ^b	5'-AGTCGGGTGG-3'
OPM-16 ^b	5'-GTAACCAGCC-3'	OPS-15 ^a	5'-CAGTTCACGG-3'
OPM-20 ^{a,b}	5'-AGGTCTTGGG-3'	OPS-16 ^b	5'-AGGGGGTTCC-3'
KIT N		KIT T	
OPN-04 ^b	5'-GACCGACCCA-3'	OPT-01 ^{a,b}	5'-GGGCCACTCA-3'
OPN-06 ^b	5'-GAGACGCACA-3'	OPT-02 ^b	5'-GGAGAGACTC-3'
OPN-08 ^{a,b}	5'-ACCTCAGCTC-3'	OPT-03 ^b	5'-TCCACTCCTG-3'
OPN-12 ^a	5'-CACAGACACC-3'	OPT-05 ^{a,b}	5'-GGGTTTGGCA-3'
OPN-13 ^{a,b}	5'-AGCGTCACTC-3'	OPT-06 ^{a,b}	5'-CAAGGGCAGA-3'
OPN-16 ^b	5'-AAGCGACCTG-3'	OPT-10 ^{a,b}	5'-CCTTCGGAAG-3'
OPN-17 ^b	5'-CATTGGGGAG-3'	OPT-16 ^{a,b}	5'-GGTGAACGCT-3'
OPN-19 ^b	5'-GTCCGTA CTG-3'	OPT-17 ^a	5'-CCAACGTCGT-3'
KIT O		OPT-20 ^{a,b} 5'-GACCAATGCC-3'	
OPO-04 ^b	5'-AAGTCCGCTC-3'		
OPO-05 ^{a,b}	5'-CCCAGTCACT-3'		
OPO-11 ^{a,b}	5'-GACAGGAGGT-3'		
OPO-14 ^b	5'-AGCATGGCTC-3'		
OPO-19 ^b	5'-GGTGCACGTT-3'		
OPO-20 ^b	5'-ACACACGCTG-3'		
KIT P			
OPP-01 ^a	5'-GTAGCACTCC-3'		
OPP-04 ^b	5'-GTGTCTCAGG-3'		
OPP-09 ^b	5'-GTGGTCCGCA-3'		
OPP-14 ^{a,b}	5'-CCAGCCGAAC-3'		
OPP-16 ^a	5'-CCAAGCTGCC-3'		
OPP-20 ^{a,b}	5'-GACCCTAGTC-3'		

^a Amorces RAPD testées vis-à-vis de la souches Ach 1-1^b Amorces RAPD testées vis-à-vis de la souche 1113-5

Annexe 3 : Cartographie génétique du plasmide pCR[®] 2.1Map and Features of pCR[®] 2.1

Map of pCR[®] 2.1 The map of the linearized vector, pCR[®] 2.1, is shown below. The arrow indicates the start of transcription for the T7 RNA polymerase. The complete sequence of pCR[®] 2.1 is available from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 18).



Annexe 4 : Résultats du premier criblage des fongicides testés sur la souche Ach 1-1

Concentration (mg/L)	*Pourcentage moyen de colonies survivantes ± (écart type)							
	CAPTANE	EUPAREN	FUNGAFLOR	LIROTECT	PELT 44	SUMICO	TMTD	TOPSIN
0,1	-	102,70 ± 20,27	-	-	-	-	-	-
0,25	-	105,90 ± 13,76	0	-	-	-	114,00 ± 15,96	-
0,5	96,10 ± 08,43	82,47 ± 11,09	0	-	142,10 ± 24,09	-	90,82 ± 08,68	79,22 ± 14,39
1	78,47 ± 07,58	92,47 ± 10,04	0	-	127,10 ± 18,65	96,14 ± 12,66	90,03 ± 10,13	101,30 ± 10,23
1,5	-	-	-	-	-	94,50 ± 10,44	95,70 ± 07,38	-
2,5	-	-	-	129,30 ± 19,63	-	-	51,30 ± 15,28	-
5	-	-	0	106,50 ± 13,54	115,80 ± 18,03	0	-	46,10 ± 17,04
10	-	-	0	141,80 ± 18,38	-	0	-	-
25	-	-	-	110,50 ± 12,83	-	0	-	-
50	-	-	-	-	-	0	-	-
100	-	-	-	-	-	0	-	-

*Pourcentage moyen et écart type du nombre de levures dénombrées sur milieu comportant une concentration déterminée de matière active fongicide par rapport au témoin sans matière active. La moyenne a été calculée à partir des 4 répétitions de l'essai. Les écarts types associés ont été calculés de la même façon. Pour chaque matière active, 2 à 6 concentrations ont été testées. (-) fongicide non testé à cette concentration.

Annexe 5 : Résultats du premier criblage des antibiotiques testés sur la souche Ach 1-1

Concentration (mg/L)	*Pourcentage moyen de colonies survivantes ± (écart type)					
	CYCLOHEXIMIDE	GENETICINE	HYGROMYCINE B	SPECTINOMYCINE	STREPTOMYCINE	TETRACYCLINE
0,1	109,7 ± 11,43	-	-	-	-	-
0,25	91,89 ± 10,26	-	-	-	-	-
0,5	77,22 ± 14,83	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2,5	98,37 ± 7,895	117,3 ± 16,48	-	-	-	-
5	100,5 ± 9,566	110 ± 12,38	123,5 ± 17,4	-	-	-
10	19,07 ± 28,13	93,53 ± 12,94	80,43 ± 10,52	90,02 ± 13,11	96,79 ± 25,89	96,14 ± 15,67
25	-	0	-	103,5 ± 12,09	111,4 ± 12,34	76,06 ± 14,21
50	-	0	0	85,71 ± 14,71	81,16 ± 11,44	93,44 ± 15,93
100	-	0	0	-	-	-

*Pourcentage moyen et écart type du nombre de levures dénombrées sur milieu comportant une concentration déterminée de matière active antibiotique par rapport au témoin sans matière active. La moyenne a été calculée à partir des 4 répétitions de l'essai. Les écarts types associés ont été calculés de la même façon. Pour chaque matière active, 4 à 6 concentrations ont été testées. (-) Antibiotique non testé à cette concentration.

Annexe 6 : Résultats des combinaisons des matières actives fongicides et antibiotiques vis-à-vis de la souche Ach 1-1.

Code du milieu	Combinaisons de fongicides et antibiotiques ^a (mg/L)	% de viabilité ^b
S _{1A}	Pe (5) + Su (1,5) + Cy (5) + St (25)	58,16 ± 7,96 ^c
S _{1B}	Pe (2,5) + Su (0,5) + Cy (2,5) + St (12,5)	86,78 ± 15,26
S _{2A}	Li (25) + Tm (1,5) + Sp (25) + Te (50)	61,50 ± 17,56
S _{2B}	Li (10) + Tm (1) + Sp (25) + Te (50)	107,8 ± 16,76
S _{2C}	Li (5) + Tm (0,5) + SP (12,5) + Te (25)	102,75 ± 18,49
S ₃	Ca (0,5) + Eu (2,5) + Hy (2,5)	110,2 ± 14,07
S ₄	Su (1,5) + Tm (1,5) + St (30) + Ge (5)	72,93 ± 9,62
S ₅	Pe (5) + Eu (0,5) + St (25) + Hy (5)	95 ± 2
S ₆	Eu (0,5) + To (1) + Hy (5)	104,3 ± 6,78
S ₇	Tm (1) + SP (25) + ST (25)	92,17 ± 17,62
S _{8A}	Su (1) + Tm (1) + Cy (5) + Te (50)	60 ± 17,36
S _{8B}	Su (0,5) + Tm (0,5) + Cy (2,5) + Te (25)	83,47 ± 14,8
S _{9A}	Ca (1) + Su (1) + St (25) + Te (25)	76,52 ± 14,76
S _{9B}	Ca (0,5) + Su (0,5) + St (12,5) + Te (12,5)	95,65 ± 4,2
S ₁₀	Tm (1) + To (1) + St (25)	114,78 ± 2,82
S₁₁	Eu (1) + Su (1,5) + Hy (2,5) + St (25)	0
S ₁₂	Su (1,5) + Tm (1,5) + St (25) + Te (50)	90 ± 11,62
S ₁₃	Eu (1) + Pe (10) + Hy (2,5) + St (25)	83,56 ± 19,18
S _{14A}	Su (1,5) + Tm (1,5) + Cy (1,5) + Te (50)	98,64 ± 14,5
S _{14B}	Su (1,5) + Tm (1,5) + Cy (1) + Te (50)	98,63 ± 5,56
S ₁₅	Ca (1) + Su (1,5) + St (30) + Te (50)	106,8 ± 6,02
S ₁₆	Su (1,5) + Tm (1,5) + St (25) + Ge (2,5)	101,37 ± 19,24
S _{17A}	Su (1,5) + Tm (1,5) + Te (50) + Ge (5)	75,34 ± 4,35
S _{17B}	Su (1,5) + Tm (1,5) + Te (50) + Ge (2,5)	102,73 ± 16,36
S₁₈	Eu (0,5) + Su (1) + Hy (2,5) + St (30)	102,74 ± 13,21
S ₁₉	Su (1,5) + Tm (1,5) + Cy (1,5) + Te (50)	88,6 ± 11,38
S ₂₀	Su (1,5) + Tm (1,5) + Cy (1,5) + Ge (2,5)	86,91 ± 6,09
S ₂₁	Su (1,5) + Te (1,5) + Cy (1,5) + St (25)	101 ± 6,25
S ₂₃	Eu (1) + Pe (6,25) + Hy (2,5) + ST (30)	102,53 ± 17,08
S ₂₄	Su (1,5) + Eu (0,5) + Ge (2,5) + Te (50)	113,36 ± 4,64
S ₂₅	Eu (1) + Pe (6,25) + Hy (2,5) + Ge (2,5)	90,08 ± 5,82
S ₂₆	Su (1,5) + Tm (1,5) + Hy (2,5) + Cy (1,5)	87,14 ± 12,75
S ₂₇	Su (1,5) + Tm (1,5) + Cy (1,5) + Ge (2,5)	4 ± 1,73
S ₂₉	Eu (0,5) + Su (1) + St (30) + Ge (2,5) + Te (50)	72,42 ± 3,78
S ₃₀	Eu (0,5) + Su (1) + Hy (5) + St (30)	47,36 ± 13,74
S ₃₁	Eu (0,5) + Su (1,5) + Hy (5) + Ge (5)	17,29 ± 4,58

^a Pelt44 (Pe), Lirotect (Li), Captane (Ca), TMTD (Tm), Topsin (To), Sumico (Su), Euparen (Eu), Hygromycine B (Hy), Streptomycine sulfate (St), Spectinomycine (Sp), Tétracycline (Te), Cycloheximide (Cy), Généticine (G).

^b % de viabilité = [(ufc sur milieu testé)/(ufc sur milieu PDA)] x 100

^c moyenne de 4 répétitions ± Ecart type

Annexe 7 : Densités de population [(ufc/cm²) ± (Ecart-type)] d'*A. pullulans* à la surface des pommes traitées avec la souche Ach 1-1 ou la souche 1113-5 et des pommes non traitées (Témoins).

	Pommes traitées avec la souche Ach 1-1	Pommes traitées avec la souche 1113-5	Pommes non traitées
Avant stockage	$1,43 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3$	$1,47 \times 10^4 \pm 1,70 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3 \pm 1,46 \times 10^2$
2 jours après stockage	$1,10 \times 10^4 \pm 1,30 \times 10^3$	$1,17 \times 10^4 \pm 0,70 \times 10^3$	$1,15 \times 10^3 \pm 2,00 \times 10^2$
7 jours après stockage	$1,40 \times 10^4 \pm 1,20 \times 10^3$	$1,80 \times 10^4 \pm 1,17 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^2$
14 jours après stockage	$1,46 \times 10^4 \pm 0,52 \times 10^3$	$1,13 \times 10^4 \pm 0,71 \times 10^3$	$1,40 \times 10^3 \pm 4,52 \times 10^2$
21 jours après stockage	$1,57 \times 10^4 \pm 1,60 \times 10^3$	$1,26 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3 \pm 2,61 \times 10^2$
28 jours après stockage	$1,20 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^3$	$1,11 \times 10^4 \pm 0,40 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3 \pm 2,80 \times 10^2$
35 jours après stockage	$1,00 \times 10^4 \pm 0,87 \times 10^3$	$0,77 \times 10^4 \pm 0,80 \times 10^3$	$0,46 \times 10^3 \pm 0,78 \times 10^2$
49 jours après stockage	$0,61 \times 10^4 \pm 0,63 \times 10^3$	$0,50 \times 10^4 \pm 0,76 \times 10^3$	0
60 jours après stockage	$0,58 \times 10^4 \pm 0,20 \times 10^3$	$0,47 \times 10^4 \pm 0,26 \times 10^3$	0

APPENDICES

*« Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs
n'a jamais tenté d'innover. »*
[Albert Einstein]

Appendice 1 : Milieux de cultures utilisés

Milieu de culture	Préparation
PDA	Pour 1 litre de milieu (40 boîtes de Petri) Peser 39 g de potatose dextrose agar Amener à 1 litre avec de l'eau distillée Autoclaver à 120°C pendant 20 min.
YEPD	Pour 1 litre de milieu liquide Peser 10 g d'extrait de levure 20 g de peptone 20 g Glucose (Dextrose) Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée et chauffer un peu pour dissoudre Autoclaver à 110°C pendant 20 min
NZY	Pour 1 litre de milieu Peser 21 g de NZY Amener à 1 litre avec de l'eau distillée Autoclaver à 120°C pendant 20 min
NZY-agar	Pour 1 litre de milieu Peser 21 g de NZY 15 g d'agar-agar Amener à 1 litre avec de l'eau distillée Autoclaver à 120°C pendant 20 min

Appendice 2 : Tampons utilisés

Tampon	Préparation
Tris HCL 1 M	Pour un litre de tampon Peser 12,1 g Tris hydroxy-méthyl-amino-méthane Dissoudre dans 800 mL d'eau distillée Ajuster le pH à 8 avec du HCl Amener à 1 litre avec de l'eau distillée
EDTA 0,5 M	Pour un litre de tampon Peser 186,1 g de disodium éthylène diamine-tétra-acétate 2 H ₂ O Dissoudre dans 800 mL d'eau distillée Ajuster le pH à 8 avec du NaOH Amener à 1 litre avec de l'eau distillée
TE 10X	Pour un litre de TE 10X concentré Peser 12,11 g de Tris 3,72 g d'EDTA Ajouter 800 mL d'eau distillée et ajuster le pH à 8,00 avec du HCl Ajuster à 1 litre
Breaking buffer (tampon de lyse)	2% (V/V) Triton 100x 1% (V/V) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris HCl pH 8 1 mM EDTA pH 8
Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique	Mélanger 25 vol de phénol 24 vol de chloroforme 1 vol d'alcool isoamylique Ce mélange doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière
SDS 10%	Pour un litre de solution Peser 100 g du SDS Dissoudre dans 800 mL d'eau distillée Chauffer à 70°C Ajuster le pH à 7,2 avec du HCl Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée
TBE 10X	Pour un litre de solution Peser 162 g de Tris 27,5 g d'Acide borique 9,5 g d'EDTA Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée
Solution de charge (bleu de bromophénol)	50 % (V/V) Glycérol 5mM EDTA 0,25% (W/V) Bleu de bromophénol Enfin diluer au 1/10 dans du TE 1X
KPB	phosphate de potassium monobasique KH ₂ PO ₄ à 0,05 M Pour 1 litre, peser 6,8 g phosphate de potassium dibasique K ₂ HPO ₄ à 0,05M Pour un litre, peser 8,71 g Pour préparer 1 litre de KPB à 0,05M ; pH 6,5 mélanger 685 mL de KH ₂ PO ₄ 315 mL de K ₂ HPO ₄ vérifier le pH et ajuster si nécessaire Finalement ajouter 500 µL de tween 80
IPTG	Pour 10 mL de solution Peser 238 mg d'IPTG et dissoudre dans 10 mL d'eau distillée Filtrer de façon stérile sous flux à l'aide d'une seringue et d'un acrodisc 0,45µm de diamètre Aliquoter en eppendorfs stériles et conserver à -20°C
X-GAL	Pour 10 mL de solution Peser 400 mg de X-GAL et ajouter 10 ml de Diméthylformamide Conserver à -20°C et à l'abri de la lumière