

+ B

DOSSIER RECHERCHE**UTILISATION DES BIOPESTICIDES POUR
LA PROTECTION DES POMMES EN CONSERVATION (*)**

par M.H. JIJAKLI et P. LEPOIVRE
UER de Phytopathologie
Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux

1. INTRODUCTION

Les systèmes agricoles que connaissent nos pays industrialisés sont caractérisés par une utilisation intensive des sols, une homogénéité génétique des cultures, une spécialisation à grande échelle ainsi qu'une mécanisation importante. Ces pratiques culturales aggravent l'impact et la fréquence des maladies nécessitant un recours fréquent aux interventions phytosanitaires qui peuvent présenter des effets négatifs sur l'environnement et favoriser le développement d'agents pathogènes résistants aux matières actives en usage. Face à ces considérations et à l'attitude des consommateurs sensibilisés par le coût environnemental des intrants agricoles tout en exigeant des produits de qualité, de nouvelles stratégies de production tentent d'émerger, visant à assurer une rentabilité adéquate pour l'agriculture et un moindre dommage pour l'environnement.

Parmi les alternatives de lutte envisagées, les laboratoires de recherche se penchent activement depuis de nombreuses années sur les moyens de lutte biologique qui visent à contrôler les agents pathogènes au moyen de ce qu'on appelle les biopesticides (c.-à-d. des moisissures, des bactéries, des virus ou des produits de leur métabolisme). Cependant par rapport au nombre de molécules de synthèse homologuées de par le monde, le nombre d'agents de lutte biologique homologués pour le contrôle des maladies reste insignifiant (1 % du marché). En Belgique, seuls trois produits à base de micro-organismes ont été agréés. Il en est de même aux Pays-Bas (cf tableau n° 1).

L'emploi de biopesticides en agriculture est-il dès lors une utopie et est-il réaliste de vouloir transformer les phénomènes naturels d'antagonisme microbien en systèmes de lutte efficace répondant adéquatement aux exigences de l'industriel, de l'utilisateur, du consommateur et

satisfaisant les instances d'homologation des produits phytosanitaires ? Nous tenterons de répondre à ces questions en prenant comme cas particulier l'utilisation des biopesticides sur pommes en conservation et en passant en revue toutes les étapes nécessaires à une commercialisation d'un tel produit.

Tableau n° 1 — Liste des biopesticides agréés en Belgique et aux Pays-Bas

BELGIQUE	PAYS-BAS
<i>Bacillus thuringiensis</i> (1972*) Insecticide contre les lépidoptères	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1972) idem
<i>Trichoderma viride</i> (1984) Traitement contre <i>Ceratocystis ulmi</i>	<i>Verticillium lecanii</i> (1993) Insecticide contre la mouche blanche
<i>Trichoderma harzianum</i> (1989) Traitement contre <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Botrytis</i> sur sol	<i>Verticillium dahliae</i> (1993) Insecticide contre <i>Ceratocystis ulmi</i>

* : année d'homologation

2. DEFINITION DU MARCHÉ

Avant d'entamer toute recherche, le marché ciblé doit être clairement défini en tentant de privilégier les systèmes de productions où les méthodes chimiques sont inexistantes ou ne sont pas acceptées au niveau législatif et/ou économique.

Nos recherches se sont portées sur la mise au point d'un traitement biologique contre le complexe *Botrytis cinerea* (pourriture grise) et *Penicillium* sp. (la pourriture bleue) sur pommes en conservation. Ces deux maladies sont très

(*) Travail subsidié par la Communauté Européenne (Contrat CAMAR n° 8001-CT91-0106).

répandues et peuvent occasionner des pertes importantes en se développant sur les fruits blessés.

Le nombre de matières actives chimiques autorisées sur pommes après récolte est très limité et leur emploi intensif a entraîné l'apparition de souches résistantes. En Belgique, une seule matière active est autorisée après récolte contre *Botrytis* et *Penicillium* : l'imazalil. Six autres matières actives ne peuvent être appliquées qu'au moins 15 jours avant récolte. En France, seul le thiabendazole peut être employé après récolte contre ces deux agents de pourriture. Trois autres matières peuvent également être utilisées contre les maladies de conservation mais avant récolte.

La recherche d'un traitement biologique constituerait une alternative possible permettant une amélioration de la conservation et de la qualité des fruits, d'autant plus que les produits agricoles de post-récolte ont une valeur ajoutée élevée et que les paramètres environnementaux des chambres de stockage sont bien définis et stables au cours du temps. La variabilité de ces paramètres au champ est souvent un facteur limitant l'efficacité des agents de lutte biologique.

3. SELECTION

Une fois l'objectif de lutte correctement défini, la constitution d'une collection de micro-organismes et la sélection des souches antagonistes les plus efficaces doivent être entamées. Le prélèvement des antagonistes se fera de préférence au niveau des sites à protéger. Nous avons dans un premier temps caractérisé l'évolution des populations microbiennes épiphytiques des pommes au cours de leur conservation. Dans un second temps, la capacité de 329 souches à protéger les pommes

contre l'infection par les deux agents pathogènes a été évaluée. Nous avons effectué l'évaluation de ces souches directement sur pommes artificiellement blessées et inoculées par le pathogène. En effet, l'antagonisme d'un micro-organisme s'exprimant en conditions *in vitro* n'est pas automatiquement reproductible *in vivo*.

Sur pommes, la population épiphytique des bactéries et des levures atteint une densité maximale 60 jours après récolte. Cependant, parmi les 329 souches évaluées, près de 90 % des souches antagonistes efficaces vis-à-vis des deux agents pathogènes ont été isolées après récolte ou après 15 jours de conservation (cf *graphique n° 1*). Il est donc préférable d'isoler des souches potentiellement antagonistes en début de conservation des fruits. Après divers criblages de plus en plus sévères, deux levures, *Pichia anomala* (souche K) et *Candida sake* (souche O) ont été sélectionnées pour leur activité protectrice élevée contre *B. cinerea* et *Penicillium* sp. (pourcentage de protection supérieur à 90 % pour une application des levures à une concentration de 10⁷ ufc/ml) sur Golden Delicious. Cet effet protecteur s'observait tant à 5°C qu'à 25°C (cf *tableau n° 2*).

4. FERMENTATION

Lorsque le nombre de souches potentiellement actives est suffisamment réduit, l'aptitude des micro-organismes à la production en masse et au séchage dans des conditions économiquement acceptables doit être évaluée. Le coût de production d'un micro-organisme inclut le milieu de culture et l'énergie nécessaire à la conduite de la culture et au séchage de celle-ci. Certains adjuvants peuvent être additionnés (protectants, "car-

Graphique n° 1 — Efficacité des souches vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et *Penicillium* sp. en fonction de leur date de prélèvement sur la surface des pommes après récolte

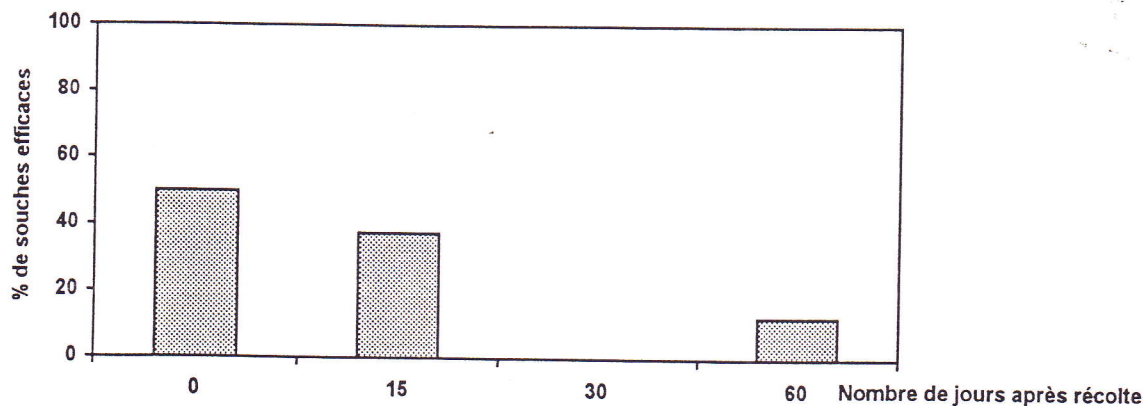


Tableau n° 2 — Schéma de sélection des souches efficaces contre *B. cinerea* et *Penicillium* sp.

	Critères de sélection	Nombre et type de souches retenues
Premier criblage	efficacité à 25°C	33 souches de levures et bactéries
Deuxième criblage	efficacité à 5°C	7 souches de levures
Troisième criblage	Temps minimum d'incubation entre l'inoculation de l'antagoniste et du pathogène permettant une protection supérieure à 90 %	4 souches de levures
Quatrième criblage	Concentration minimale requise de l'antagoniste permettant une protection supérieure à 90 %	2 souches : <i>Pichia anomala</i> (souche K) <i>Candida sake</i> (souche O)

riers"... afin d'améliorer la viabilité des souches à ces différentes opérations.

Les deux levures que nous avons sélectionnées, ont été produites en fermenteur par le CWBI (Centre Wallon de Bio Industrie) et séchées sur lit fluidisé tout en conservant leur activité de protection vis-à-vis des deux agents pathogènes.

5. FORMULATION

Cette étape importante est souvent négligée alors qu'elle doit permettre de conditionner le produit afin qu'il soit stable (temps de demi-vie suffisant), facile à préparer (mise en suspension aisée,...) et à appliquer avec un matériel standard. Une bonne formulation préserve la viabilité et l'efficacité du micro-organisme et stabilise la protection apportée par les souches antagonistes dans un environnement qui n'est pas toujours adéquat.

Nous avons évalué l'effet additionnel de trois types d'adjuvants.

a) Les éléments nutritifs :

Parmi 15 composés azotés et 14 glucides appliqué à 0,2 % en combinaison avec les levures, un seul élément, le 2-déoxy-D-glucose, a entraîné une protection de 30 % supérieure à celle observée lors du traitement par les antagonistes seuls contre le développement de *B. cinerea* et *Penicillium* sp. (cf graphique n° 2). Cet analogue du glucose, appliqué seul à une concentration de 0,2 % sur les blessures sur pommes, assurait une protection de 34 % vis-à-vis de *B. cinerea*. Des essais *in vitro* ont montré une inhibition de la germination des spores

et de la croissance hyphale lorsqu'il était appliqué à une concentration de 0,2 % en solution aqueuse. Par contre, aucun effet (stimulateur ou inhibiteur) du 2-déoxy-D-glucose n'a été observé sur la cinétique de colonisation des blessures par les souches K et O.

b) Les sels minéraux :

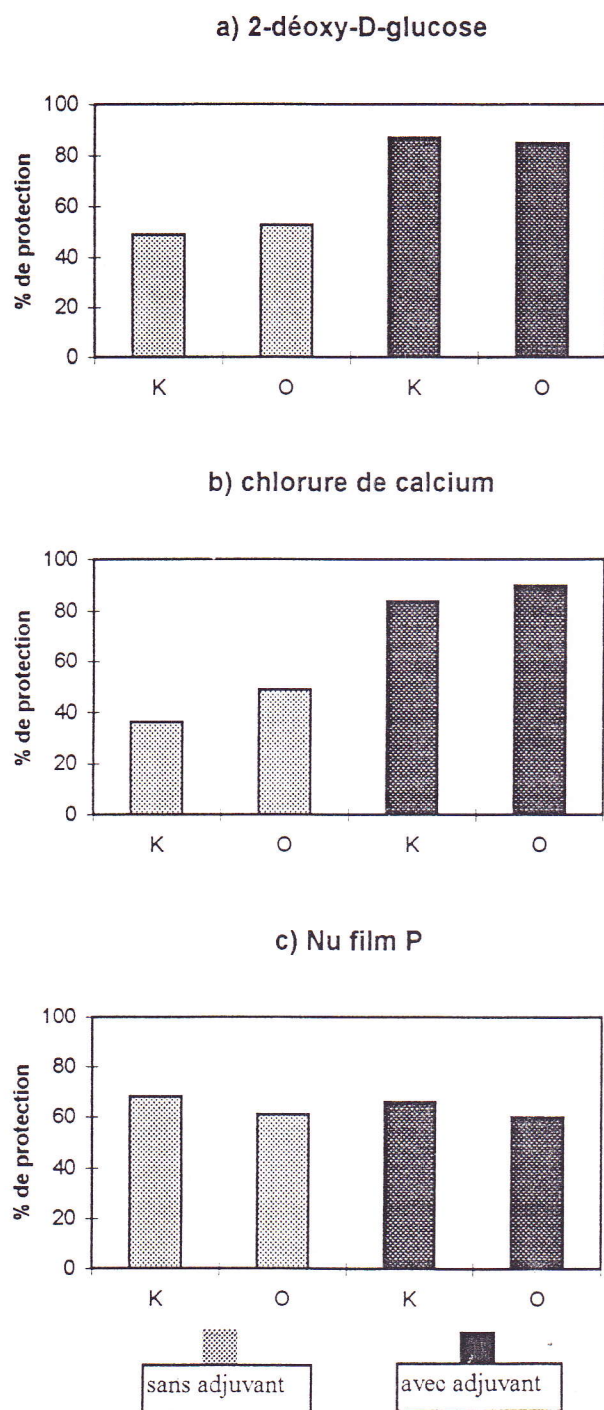
Les essais ont porté sur le chlorure de calcium. Lorsqu'il est appliqué seul 24 heures avant l'inoculation de *B. cinerea*, ce sel de calcium contrôle le développement de l'agent pathogène (protection supérieure à 90 %), alors que déposé en même temps que le champignon, il n'offre que peu de protection (inférieure à 15 %). D'autre part, le traitement conjugué du calcium avec l'antagoniste accroît la protection par rapport à celle apportée par l'application de l'antagoniste seul (cf graphique n° 2).

c) Les cires et films plastiques :

Une cire (le folicote) et trois films plastiques (le Tricaprylate, le Vapor-guard et le Nu film P) ont été évalués. Seul le Nu film P, agréé par ailleurs en agriculture biologique, s'est montré non toxique *in vitro* vis-à-vis des souches de levures K et O. Toutefois, il n'a pas provoqué un effet protecteur additionnel à l'action des levures vis-à-vis de *B. cinerea* (cf graphique n° 2).

Peu de données sont publiées dans le domaine de la fermentation et de la formulation des biopesticides, sans doute pour des raisons de secret industriel de production. Mais il est clair qu'une collaboration plus étroite entre les phytopatholo-

Graphique n° 2 — Efficacité des souches K et O vis-à-vis de *B. cinerea* en présence ou en l'absence d'adjuvants de formulation



% de protection : pourcentage moyen de deux répétitions au cours du temps. Ce pourcentage de protection vis-à-vis de *B. cinerea* est calculé en fonction de témoins inoculés uniquement avec l'agent pathogène, K et O : ce sont les souches de *Pichia anomala* et de *Candida sake* appliqués à une concentration de 10^5 ufc/ml. Les adjuvants ont été appliqués à une dose de 0,2 % pour le 2-déoxy-D-glucose, et à 2 % pour le sel de calcium et le Nu film P.

gistes et les technologues produisant des agents de lutte biologique doit contribuer à stimuler le passage des essais en laboratoire à une application pratique.

6. MECANISMES D'ACTION

Les relations d'antagonisme s'appuient sur des phénomènes très divers de compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), d'antibiose, de parasitisme de l'agent pathogène ou encore de protection indirecte en induisant chez la plante des réactions de défense.

La compréhension des propriétés antagonistes devrait permettre la mise en œuvre d'un protocole de sélection de souches plus efficaces tenant compte du (ou des) mécanisme(s) d'action impliqué(s) dans la protection. Une formulation spécifique pourrait être définie en vue de protéger ou de renforcer ces mécanismes. Ceux-ci peuvent être utilisés comme critères de contrôle de la qualité des produits dans les procédures de production industrielle et également faciliter la constitution d'un dossier en vue de l'homologation du biopesticide. Nous voyons donc que cette étape est aussi importante mais elle reste difficile à mener à bien car les interactions entre la plante hôte, le pathogène et l'antagoniste sont complexes.

En ce qui concerne nos deux levures antagonistes, nous avons pu démontrer que :

a) L'effet de protection dû aux deux souches antagonistes les plus performantes est étroitement lié à la colonisation des blessures. Les populations maximales de levure ont été atteintes après 12 heures d'incubation. Le pourcentage de protection a augmenté avec le temps d'incubation qui sépare l'application du traitement antagoniste et l'inoculation du pathogène. Ces résultats suggèrent que la protection due aux levures est étroitement liée à la colonisation des sites blessés, et que cet effet protecteur ne peut s'expliquer uniquement en terme d'inhibition de la germination des spores de *B. cinerea*.

b) Il semble également que la protection observée ne peut s'expliquer par la production de métabolites toxiques par *Pichia anomala*. Ces résultats sont cependant à prendre avec beaucoup de précautions car le protocole expérimental adopté ne permettait de mettre en évidence que des métabolites toxiques produits *in vitro*.

c) Une activité enzymatique b-1.3 glucanase a été détectée dans les filtrats de culture des souches K et O. Les niveaux d'activité mesurés dépendaient de la souche de levure, du temps d'incubation des souches et du milieu de culture. En effet, l'activité b-1.3 glucanase des filtrats du milieu contenant les parois de *B. cinerea* s'est révélée supérieure à celle observée dans le milieu laminarine, cette différence étant très prononcée dans le cas de la souche K. Cet enzyme hydrolytique à activité antimicrobienne possède la propriété d'altérer les parois d'agents phytopathogènes. L'action de cet enzyme dans l'activité protectrice des levures est encore à vérifier sur notre modèle.

7. INTEGRATION DE LA LUTTE BIOLOGIQUE A D'AUTRES TECHNIQUES DE CONTROLE DES PATHOGENES

Cette étape consiste à apprécier d'une part, la compatibilité du contrôle biologique avec la lutte contre d'autres parasites et, d'autre part, à évaluer la possibilité d'intégrer le traitement par les antagonistes dans la chaîne des opérations de conditionnement des fruits avant leur mise en conservation. Dans le cas particulier des pommes en condition de post-récolte, il faut assurer la protection des fruits contre les infections latentes de *Gloeosporium* qui est un des principaux agents également visé par les traitements chimiques traditionnels. Nous avons donc combiné des traitements thermiques dirigés contre les *Gloeosporioses* avec des applications des deux souches de levures.

a) Essai 1993

Un traitement thermique effectué par trempage des pommes dans de l'eau à 45°C (pendant 10 minutes) s'est montré efficace contre les infections latentes dues aux *Gloeosporioses* sur pommes mais a sensibilisé celles-ci vis-à-vis de *Penicillium*. Le développement de ce pathogène a pu être maîtrisé par trempage, après l'application du traitement à la chaleur, dans un mélange des deux souches de levures (K et O) en suspension dans le Nu film P.

b) Essai 1994

Le traitement thermique par trempage des pommes suivi d'une application des deux levures

en suspension dans le Nu film P a confirmé son efficacité contre le complexe *Gloeosporium*, *Penicillium* et *Botrytis*. Par contre, un traitement à la chaleur sèche (24 heures à 38°C) suivi d'une application des souches antagonistes par nébulisation s'est avéré inefficace contre les deux agents.

Lors de ces deux essais, la qualité technologique des pommes (diamètre, poids, couleur, acidité, degré brix, texture), n'a pas été altérée par le traitement combiné à la chaleur et aux levures.

8. HOMOLOGATION

Cette étape doit démarrer le plus tôt possible car les procédures exigées demandent du temps et de l'argent et doivent garantir l'efficacité aux utilisateurs et l'innocuité absolue des micro-organismes sur l'environnement et l'homme.

Les Etats-Unis possèdent depuis 1980 un règlement unique relatif à la commercialisation et à l'usage des biopesticides. En Europe, la Grande-Bretagne a été pionnière en matière de réglementation en émettant une liste des exigences que doivent satisfaire les agents de lutte biologique. Bien qu'un questionnaire soit aussi demandé, la Hollande a décidé de traiter au cas par cas l'homologation des biopesticides par souci de flexibilité en réunissant un comité constitué de représentants des ministères de l'agriculture, de l'environnement, de l'emploi et de la santé.

Au niveau européen, aucune directive en matière d'homologation phytosanitaire n'est apparue avant juillet 1993, ce qui n'a guère encouragé l'enregistrement des biopesticides. Depuis cette date, en vue d'harmoniser le marché phytopharmaceutique, la directive CEE/91/414 est d'application et considère les biopesticides comme des produits de protection des plantes.

Certaines caractéristiques doivent être connues pour qu'une nouvelle substance soit introduite sur le marché :

- a) la dose journalière acceptable pour l'homme,
- b) le niveau d'exposition acceptable pour l'opérateur,
- c) l'impact sur l'environnement et les espèces non ciblées,
- d) si la substance est un micro-organisme ou un virus, il faut ajouter :
 - les risques prévisibles,
 - l'identité de l'organisme.

- les propriétés biologiques,
- la fonction, les conditions d'utilisation, la méthode de production, ...
- toxicologie, pathogénicité et infectivité,
- résidus des produits traités,
- comportement dans l'environnement,
- écotoxicologie.

Le niveau d'exigence pour l'homologation des agents de contrôle biologique devient si élevé qu'il peut décourager le développement des biopesticides eu égard à la taille restreinte du marché. La commission a annoncé une révision de cette directive. Dans le cas où une substance active appartient à une famille de micro-organismes ou virus connus pour leur non pathogénicité, leur stabilité génétique, ..., certaines études coûteuses pourraient être évitées.

Les procédures d'homologation européennes restent donc lentes et compliquées et laissent peu d'espace pour le cas par cas. A l'opposé, aux Etats-Unis, Ecosystème a pu en 4 ans développer un biopesticide (bio-save™ 11) à base de *Pseudomonas syringae* contre *Penicillium*, *Botrytis* et *Mucor* sur pommes et poires. Ce produit sera commercialisé en août 95, montrant une réelle volonté des autorités américaines de promouvoir ce type de produit sur le marché.

9. CONCLUSIONS

La recherche de moyens de lutte biologique respectant l'environnement et augmentant la qualité des produits semble être une approche attractive pour mener à bien une stratégie de contrôle des maladies de pommes en conservation. Le remplacement de tous les pesticides chimiques par la lutte biologique ne constitue pas un objectif raisonnable. Ces biopesticides devront être considérés comme un des moyens disponibles dans une stratégie de lutte intégrée.

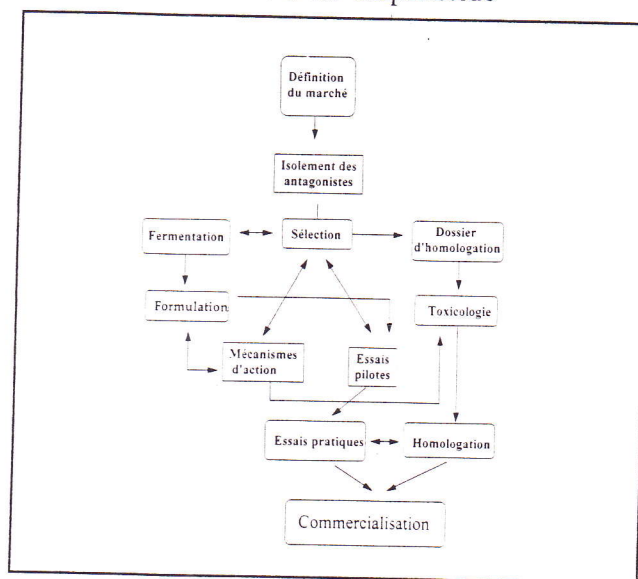
Les différentes étapes (cf figure n° 1), du concept à la commercialisation du produit, soulèvent plusieurs exigences dont la satisfaction permettra la mise en pratique de ce produit de lutte :

a) Les critères que doivent remplir les biopesticides, doivent être considérés comme un tout. Les chances d'aboutir à un produit peuvent être limitées par des exigences techniques, économiques et réglementaires, chacune de ces exigences étant essentielle et complémentaire des autres.

b) Le développement d'un partenariat entre les entreprises de production en masse et les laboratoires de phytopathologie est indispensable à l'émergence d'outils économiquement viables.

c) Parallèlement, les instances publiques d'homologation devront montrer une réelle volonté de mettre ce type de produit sur le marché en facilitant et en encourageant ces nouvelles techniques.

Figure n° 1 — Etapes nécessaires à la commercialisation d'un biopesticide



LITTÉRATURE CHOISIE

- FOKKEMA, N.J., KÖHL, J. & ELAD, Y. (eds, 1993). Biological Control of Diseases. In : IOBC/WPRS Bulletin. Monfavet, vol. 16 (11), 246.
- JANISIEWICZ W. (1991). Biological Control of Postharvest Fruit Diseases. In : Handbook of Applied Mycology, (eds ARORA, D.K., RAI, B., MUKERJI, K., G. & KNUDSEN G., R.), New York, Basel, HongKong, Marcel DEKKER, Inc., vol 1, 301-316.
- JIAKLI, M.H., CHOUTKA, C. et LEPOIVRE P. (1993). Formulation and Integrated Use of Two Antagonistic Yeasts to Postharvest Treatments against Diseases on Apples. Proceedings of an EC Workshop : Biological Control of Fruit and Foliar Disease, 107-117.
- JIAKLI, M.H., LEPOIVRE, P., TOSSUT, P. et THONARD, P. (1993). Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on Postharvest Apples by Two Antagonistic Yeasts. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, vol 58/3b, 1349-1358.