



HAL
open science

Discrimination des fruits issus de l'agriculture biologique par analyse comparative de leurs communautés microbiennes

Céline Bigot

► **To cite this version:**

Céline Bigot. Discrimination des fruits issus de l'agriculture biologique par analyse comparative de leurs communautés microbiennes. Biotechnologies. Montpellier SupAgro, 2015. Français. NNT : 2015NSAM0018 . tel-01404355

HAL Id: tel-01404355

<https://theses.hal.science/tel-01404355>

Submitted on 28 Nov 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
**L'École nationale supérieure agronomique de
Montpellier (SupAgro)**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences des Procédés - Sciences des Aliments (SP-SA)

Et de l'unité de recherche
**Démarche intégrée pour l'obtention d'aliments de
qualité (Qualisud, CIRAD)**

Spécialité : **Biotechnologie, microbiologie**

Présentée par : **Céline Bigot**

**Discrimination des fruits issus de l'agriculture
biologique par analyse comparative de leurs
communautés microbiennes**

Soutenue publiquement le **21 Octobre 2015** devant le jury composé de

| | |
|---|-------------------------------|
| M^{me} Maria URDACI , <i>Professeur, ENITA (Bordeaux)</i> | Rapporteur/Présidente du jury |
| M. Michel GAUTIER , <i>Professeur, Agrocampus Ouest (Rennes)</i> | Rapporteur |
| M^{me} Marie-Line DAVERAN-MINGOT , <i>MCF, LISBP-INSA (Toulouse)</i> | Examineur |
| M. Jean-Jacques GODON , <i>Directeur de recherche INRA (Narbonne)</i> | Examineur |
| M. Didier MONTET , <i>Directeur de recherche, CIRAD (Montpellier)</i> | Directeur de thèse |
| M. Jean-Christophe MEILE , <i>Docteur, CIRAD (Saint-Pierre)</i> | Encadrant |
| M. Sébastien CAVAIGNAC , <i>Docteur, Invenio (Ste Livrade Sur Lot)</i> | Invité |

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
**L'École nationale supérieure agronomique de
Montpellier (SupAgro)**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences des Procédés - Sciences des Aliments (SP-SA)

Et de l'unité de recherche
**Démarche intégrée pour l'obtention d'aliments de
qualité (Qualisud, CIRAD)**

Spécialité : **Biotechnologie, microbiologie**

Présentée par : **Céline Bigot**

**Discrimination des fruits issus de l'agriculture
biologique par analyse comparative de leurs
communautés microbiennes**

Soutenue publiquement le **21 Octobre 2015** devant le jury composé de

| | |
|---|-------------------------------|
| M^{me} Maria URDACI , <i>Professeur, ENITA (Bordeaux)</i> | Rapporteur/Présidente du jury |
| M. Michel GAUTIER , <i>Professeur, Agrocampus Ouest (Rennes)</i> | Rapporteur |
| M^{me} Marie-Line DAVERAN-MINGOT , <i>MCF, LISBP-INSA (Toulouse)</i> | Examineur |
| M. Jean-Jacques GODON , <i>Directeur de recherche INRA (Narbonne)</i> | Examineur |
| M. Didier MONTET , <i>Directeur de recherche, CIRAD (Montpellier)</i> | Directeur de thèse |
| M. Jean-Christophe MEILE , <i>Docteur, CIRAD (Saint-Pierre)</i> | Encadrant |
| M. Sébastien CAVAIGNAC , <i>Docteur, Invenio (Ste Livrade Sur Lot)</i> | Invité |

« On ne juge pas un homme sur le nombre de fois qu'il tombe mais sur le nombre de fois qu'il se relève. »

Proverbe martial de Maître Jigoro Kano

« ...Le chemin est long, les racines sont amères, mais le fruit est doux. »

Proverbe martial de Maître Pham Xuân Tong

A mis padres, mi hermana y mi hermano

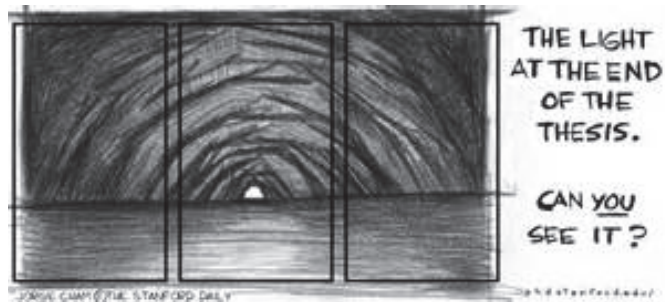
A mi novio

A mi familia y amigos

Remerciements



Il est très difficile d'exprimer par des mots la gratitude que je ressens envers toutes les personnes (et elles sont nombreuses !) qui ont su contribuer directement et indirectement au bon déroulement de



cette thèse. D'avoir été présentes aussi bien pour les moments agréables que pour les moments désagréables et de m'avoir soutenu (et souvent supporté...) jusqu'à la fin.

My thesis is written in



Je tiens donc à témoigner du fond du cœur ma reconnaissance et ma gratitude à toutes ces personnes, pour leur inestimable contribution, tout en m'excusant auprès des personnes dont le nom ne figurerait pas dans ces lignes.

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent aux institutions CIRAD, SupAgro et UM pour avoir créé les conditions financière et d'accueil nécessaires à la réalisation de ces travaux.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à la Présidente du jury Professeur Urdaci et au Professeur Gautier d'avoir accepté d'en être les rapporteurs, d'avoir consacré du temps à l'analyse et à la critique de ce travail de recherche.

Parmi ces membres, mon ancienne directrice de Master Professionnel « Diagnostic microbiologique : approches innovantes » de Toulouse, le Dr Daveran-Mingot, sans qui je ne serai pas arrivée jusque-là : elle a su me guider dans mon parcours durant mon Master 1, mais surtout elle a pris le temps de m'écouter et de m'orienter dans mes moments de doutes, sans

m'influencer sur mon choix pour la suite de mon cursus. L'occasion m'est à nouveau donnée de vous remercier Dr Daveran-Mingot, je suis sincèrement heureuse que vous ayez accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse.

Merci également au Dr Godon d'avoir accepté de faire partie des membres du jury et du comité de thèse, pour ses remarques et conseils scientifiques qui m'ont aidé à mener à bien ces travaux.

Un grand merci au Dr Cavaignac pour l'intérêt qu'il a manifesté en participant à ce projet et en participant aujourd'hui en qualité de membre invité à ce jury.

Je voudrais remercier tout particulièrement mon directeur de thèse le Dr Didier Montet et mon encadrant le Dr Jean-Christophe Meile. Ils ont toujours été disponibles, à l'écoute de mes nombreuses questions, se sont toujours intéressés à l'avancée de ces travaux et m'ont fait profiter de la dimension internationale de la recherche, notamment au travers des conférences. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que leurs conseils sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail. J'ai été extrêmement sensible à leurs qualités de chercheur mais également à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Ils ont toujours répondu présent lorsque j'avais besoin de soutien moral. Les mots ne seront jamais assez forts pour exprimer toute la reconnaissance et le respect que je ressens pour eux. J'espère avoir été à la hauteur de la confiance qu'ils m'ont accordée et que ce travail est aussi à la hauteur de leurs espérances. Quoi qu'il en soit, j'ai beaucoup appris à leurs côtés et je suis très honorée de les avoir eu comme encadrant et directeur de thèse.

Plus généralement, je tiens à remercier les membres de l'Unité Qualisud et plus particulièrement l'équipe 2 « Maîtrise des contaminants le long de la chaîne alimentaire », aussi bien chercheurs, techniciens, stagiaires ou doctorants. Car même s'il est dit de la thèse que c'est un travail solitaire, je n'ai pas ressenti les choses ainsi. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien de toutes ces personnes dont la générosité, la bonne humeur, l'amitié et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

Merci au Dr Christophe Bugaud pour nous avoir fournis les échantillons de bananes de Martinique mais aussi pour les conseils lors des interprétations statistiques. Merci également à Mr José Efraín Camilo pour les échantillons de bananes de République Dominicaine.

Dans la période la plus difficile, j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés le soutien et les conseils d'Angélique Fontana et de Caroline Strub. Ces personnes m'ont également beaucoup apporté

durant ma thèse aussi bien pour les manips de qPCR que pour les comités de thèse et les corrections apportées à ce manuscrit. Mais aussi un grand merci à Marie-Pierre Obède pour son aide précieuse lors de l'édition de ce manuscrit, à Isabelle Métayer et Laurent Berthiot (« barbe douce » :-). Sans eux la thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui !

Lolo, ma promesse tient toujours pour le Bokken... ;-)

Je tiens à remercier Dr Philippe Clair pour son aide précieuse dans les optimisations et les interprétations des manips de qPCR/HRM.

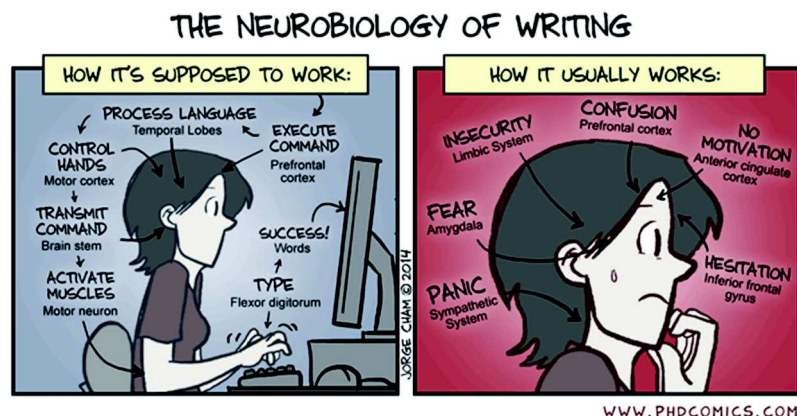
Merci Lolo, Didier, Angélique, JC, les doctorants, les stagiaires pour ces soirées (Africaines, Brésiliennes,...), balades en bateau, randos, sorties en canoé... Mais surtout pour tous ces bons moments, de rigolades, de convivialité et cette ambiance familiale, aussi bien en dehors que pendant le boulot. Je n'aurais pas autant apprécié ces trois années sans tout ça.

Magali, sans tes « on se détend ! » « détendax ! », pauses cafés sur la passerelle du CIRAD, soirées entre nous 4, balades avec Cheaper, mais aussi (et surtout) sans tes encouragements répétés au cours de la rédaction de ce manuscrit, j'aurais certainement fait mon saut dans le vide sans parachute ni élastique depuis belle lurette! Je n'oublierai jamais cette pause détente et apéritive au bord du Lez et la persévérance (ou plutôt testardise :-p) à vouloir à tout prix boire cette bière aux deux bouchons ! Merci pour tout Mag !

Merci Adeline pour ton « feu sacré de la motivation » ! Je pensais avoir usé toutes mes bûches mais finalement, même si par moment la flamme paraît très faible elle peut toujours être ravivée ! :-)

Ma Yasmine, tu vois comme quoi la thèse a des hauts et des bas c'est vrai mais au fond on n'en retient que les côtés positifs, le reste ne nous a rendu que plus fortes ! Regarde où on en est aujourd'hui :-)

Quand on pense au nombre de fois où il nous est arrivé de nous sentir nulles et de penser que quelqu'un d'autre aurait fait tellement mieux à



notre place...Surtout durant cette dure période d'écriture !

Le lien qui a pu se créer entre nous est un lien qui n'aurait été jamais aussi fort si on n'avait pas vécu tout cela ensemble. Ces moments de soutien et de partage font partie des meilleurs moments que j'ai pu vivre au CIRAD (et à Prague durant notre premier congrès international !). Ton amitié fait partie des choses les plus précieuses que je retire de cette expérience, merci beaucoup Yasmine.

Mes remerciements s'adressent enfin à mes parents, mon compagnon, ma famille et mes amis qui m'ont toujours épaulé dans ce projet. J'ai conscience que mon absence a été longue et j'espère pouvoir un jour rattraper le retard accumulé. JP, merci de m'avoir soutenu, encouragé, aidé et supporté mes crises et humeurs dépressives pendant ces longs mois de rédaction. Je te dois beaucoup...

Pour terminer, je souhaite également m'adresser aux actuels/futurs thésards : vous n'êtes/ne serez jamais seuls ! (on l'oublie trop souvent...). J'espère qu'en me lisant (ainsi que les petites BD ;-)) vous serez un peu soulagés et rassurés (car on est tous passés par là) et que vous vous rendrez compte que la thèse est la période la plus riche et la plus passionnante de votre cursus universitaire (même si, oui c'est vrai, c'est aussi la plus difficile).



Voilà, ces quelques lignes sont les dernières que je rédige à l'occasion de ce travail de recherche qui est l'aboutissement d'un long parcours et qui laisse place à un nouveau parcours qui n'est plus celui du doctorant, mais celui du chercheur. Un nouveau chapitre commence et j'espère qu'il ne sera que fructueux et sans fin, dans ce monde passionnant qu'est celui de la recherche.... !

Liste des tableaux



1. Synthèse bibliographique

Tableau 1.1. : Les produits alimentaires présentant le plus de risques de fraude.

2. Matériels et Méthodes

Tableau 2.1. : Souches microbiennes utilisées durant cette étude.

Tableau 2.2. : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des pommes.

Tableau 2.3. : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des pêches et nectarines.

Tableau 2.4. : Description des échantillonnages des bananes de Martinique.

Tableau 2.5. : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des bananes

Tableau 2.6. : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des bananes.

Tableau 2.7. : Traitements appliqués sur les pommes échantillonnées en 2013 et en 2014 : les molécules actives et leur rôle.

Tableau 2.8. : Traitements appliqués sur les bananes de République Dominicaine échantillonnées en 2013 et en 2014 : les molécules actives et leur rôle.

Tableau 2.9. : Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr 16S et 26S en vue d'analyse par DGGE ou séquençage.

Tableau 2.10. : Composition du mélange réactionnel pour une PCR utilisant l'enzyme TopTaq Polymerase.

Tableau 2.11. : Composition des solutions d'agents dénaturants : exemple de préparation d'un gel DGGE ayant un gradient dénaturant allant de 30% à 60%.

Tableau 2.12. : Amorces utilisées pour le séquençage Illumina.

3. Résultats et discussion

Tableau 3.1. : Nombre de bandes/espèces bactériennes retrouvées sur les bananes étudiées en fonction du protocole d'extraction d'ADN utilisé.

Tableau 3.2. : Nombre de bandes/espèces fongiques retrouvées sur les pommes étudiées.

Tableau 3.3. : Nombre de bandes/espèces bactériennes retrouvées sur les pommes étudiées.

Tableau 3.4. : Matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation.

Tableau 3.5. : Analyse comparative de la diversité microbienne retrouvée sur les pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2013 et 2014.

Tableau 3.6. : Résultats de la comparaison multiple de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisée à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

Tableau 3.7. : Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisée à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

Tableau 3.8. : Comparaison des charges fongiques (en nombre de copies du gène 26S/ μ L) obtenues sur les pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014).

Tableau 3.9. : Résultats de la comparaison multiple de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisée à partir des données obtenues par qPCR sur ADN bactériens (16S).

Tableau 3.10. : Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN bactériens (16S).

Tableau 3.11. : Comparaison des charges bactériennes (en nombre de copies du gène 16S/ μ L) obtenues sur les pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014) par qPCR.

Tableau 3.12. : Comparaison des températures de fusion obtenues pour l'étude globale des populations fongiques de pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014) par qPCR/HRM.

Tableau 3.13. : Comparaison des températures de fusion obtenues pour l'étude globale des populations bactériennes de pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014) par qPCR/HRM.

Tableau 3.14. : Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

Tableau 3.15. : Comparaison des charges **(A)** bactériennes et **(B)** fongiques (en nombre de copies du gène 16S ou 26S/ μ L) obtenues sur les pêches et les nectarines par qPCR.

Tableau 3.16. : Comparaison des charges bactériennes et fongiques (en nombre de copies du gène 16S ou 26S/ μ L) obtenues sur les bananes par qPCR.

Tableau 3.17. : Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

Liste des figures



1. Synthèse bibliographique

Figure 1.1. : Les systèmes de contrôle Européens de la filière du bio.

Figure 1.2. : Logos officiels de l'agriculture biologique.

Figure 1.3. : Représentation des superficies cultivées en bio (certifiées et en conversion), du nombre d'exploitations bio et de la part de la Surface Agricole Utile (SAU) totale en bio dans l'Union Européenne.

Figure 1.4. : Évolution depuis 1995 du nombre de producteurs et autres opérateurs bio et des surfaces en mode de production biologique en France.

Figure 1.5. : Les différentes étapes de la traçabilité dans l'agroalimentaire : exemple de la filière porcine.

Figure 1.6. : Organisation typique des gènes d'ARNr chez **(A)** les procaryotes et **(B)** les eucaryotes.

Figure 1.7. : Schéma du principe de la PCR-DGGE : dénaturation progressive des fragments d'ADN.

Figure 1.8. : Étapes de la PCR quantitative en temps réel avec utilisation du SybrGreen.

Figure 1.9. : Étapes de la qPCR-HRM pour la détection de mutations.

2. Matériels et Méthodes

Figure 2.1. : Échantillonnage des fruits : exemple des pommes d'Invenio

Figure 2.2. : Situation géographique des lieux de prélèvements des pommes biologiques et conventionnelles des différentes parcelles étudiées.

Figure 2.3. : Situation géographique des lieux de prélèvements des pêches et nectarines issues de 3 modes de production (biologique, conventionnel et durable).

Figure 2.4. : Situation géographique des lieux de prélèvements des bananes chez le producteur Eyma au nord de la Martinique et situé à Basse-Pointe.

Figure 2.5. : Situation géographique des lieux de prélèvements des bananes de République Dominicaine.

Figure 2.6. : Appareil DGGE utilisé, modèle Biorad Dcode (Biorad, USA).

Figure 2.7. : Étapes pour la préparation du gel DGGE :

Figure 2.8. : Calcul de la position relative (PR) de chaque bande par exploitation d'un gel DGGE.

Figure 2.9. : (A) Courbe d'amplification où la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles, (B) Courbe d'étalon.

Figure 2.10. : Principe de l'approche Illumina.

3. Résultats et discussion

Figure 3.1. : Profils DGGE des ADNr bactériens (A) extraits et amplifiés par PCR à partir de pêches échantillonnées en 2014 au CTIFL avec les analyses ACP correspondantes (B).

Figure 3.2. : Profils DGGE des ADNr bactériens (A) extraits et amplifiés par PCR à partir de nectarines échantillonnées en 2014 au CTIFL avec les analyses ACP correspondantes (B).

Figure 3.3. : Vérification des ADN génomiques extraits par la méthode phénol/chloroforme (gauche) et le kit FastDNA™ SPIN (droite).

Figure 3.4. : Profils DGGE des ADNr bactériens extraits à partir de bananes biologiques (A1) et conventionnelles (B1) échantillonnées en 2014 en République Dominicaine avec les analyses ACP (2) et de clustering (3) correspondantes.

Figure 3.5. : Profils DGGE des ADNr fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2013(A) avec les analyses ACP et (B) de clustering (C) correspondantes.

Figure 3.6. : Profils DGGE des ADNr fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

Figure 3.7. : Profils DGGE des ADNr fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

Figure 3.8. : Profils DGGE des ADN_r fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

Figure 3.9. : Profils DGGE des ADN_r fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2013 et en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

Figure 3.10. : Profils DGGE des ADN_r bactériens (A) extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 et 2013, au bord et au centre des parcelles, avec les analyses ACP (B) correspondantes.

Figure 3.11. : Graphiques des corrélations générées par l'analyse discriminante PLS.

Figure 3.12. : Graphiques des corrélations générées par l'analyse discriminante PLS.

Figure 3.13. : Résultats de la régression PLS montrant l'importance des différentes variables X (Bactn) dans le modèle (VIP) sur les deux composantes.

Figure 3.14. : Répartition des ADN fongiques identifiés en fonction de leur appartenance à une division (*Ascomycètes* vs *Basidiomycètes*) ou à un mode de production (BIO vs CONV).

Figure 3.15. : Répartition des ADN fongiques identifiés en fonction de leur appartenance à une division (*Ascomycètes* vs *Basidiomycètes*) et à une classe ou à un mode de production (bio vs conv).

Figure 3.16. : Analyse des séquences de bandes ADN bactériennes issues de gels DGGE.

Figure 3.17. : Répartition des ADN bactériens identifiés dans les phyla bactériens et les modes de production (bio vs conv).

Figure 3.18. : Répartition des ADN bactériens dans les taxons et les modes de production (bio vs conv).

Figure 3.19. : Courbe d'étalonnage d'ADN fongique (ADN_r 26S de *S. cerevisiae*).

Figure 3.20. : Charge fongique estimée par qPCR sur ADN 26S des pommes échantillonnées en 2013 (A) et en 2014 (B) à différentes positions dans les parcelles biologiques (« Bio ») et conventionnelles (« Conv »).

Figure 3.21. : Courbe d'étalonnage d'ADN bactérien (ADN_r 16S d'*E. coli*).

Figure 3.22. : Charge bactérienne estimée par qPCR sur l'ADN_r 16S des pommes échantillonnées en 2013 (A) et en 2014 (B) à différentes positions dans les parcelles biologiques (« Bio ») et conventionnelles (« Conv »).

Figure 3.23. : Courbes de fusion obtenues par HRM pour l'analyse de la richesse fongique présente à la surface de (A) pommes biologiques et (B) conventionnelles récoltées en 2013 et en 2014.

Figure 3.24. : Courbes de fusion obtenues par HRM pour l'analyse de la richesse bactérienne présente à la surface de (A) pommes biologiques et (B) conventionnelles récoltées en 2013 et en 2014.

Figure 3.25. : Comparaison des profils génétiques obtenus par HRM et DGGE pour l'étude de la flore fongique présente à la surface de pommes biologiques et conventionnelles.

Figure 3.26. : Bandes ADN bactériennes les plus discriminantes pour notre étude (ou VIP).

Figure 3.27. : Bandes ADN fongiques les plus discriminantes pour notre étude (ou VIP).

Figure 3.28. : Proportion centésimale des principaux phyla bactériens identifiés sur des pommes (A) conventionnelles et (B) biologiques récoltées en 2013.

Figure 3.29. : Proportion centésimale des bactéries minoritaires identifiées sur des pommes (A) conventionnelles et (B) biologiques récoltées en 2013.

Figure 3.30. : Graphiques des corrélations générées par l'analyse discriminante PLS

Figure 3.31. : Résultats de la régression PLS montrant l'importance des différentes variables X dans le modèle (VIP) sur la deuxième composante.

Figure 3.32. : Profils DGGE fongiques (ADNr 26S) (A) de nectarines et (B) de pêches issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

Figure 3.33. : Analyses par ACP des profils fongiques (ADNr 26S) obtenus par analyse DGGE (A) de nectarines et (B) de pêches du verger et de plateaux de la coopérative, issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

Figure 3.34. : Analyses par clustering des profils fongiques (ADNr 26S) obtenus par analyse DGGE (A) de nectarines et (B) de pêches du verger et de plateaux de la coopérative, issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

Figure 3.35. : Profils DGGE bactériens (ADNr 16S) (A) de nectarines et (B) de pêches du verger et de plateaux de la coopérative, issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

Figure 3.36. : Graphiques des corrélations générées par l'analyse discriminante PLS.

Figure 3.37. : Analyse des données DGGE sur ADN bactériens par régression PLS.

Figure 3.38. : Profils DGGE d'ADNr bactériens (ADNr 16S) (A) de bananes Cavendish de Martinique et (B) de République Dominicaine, issues de différents modes de production.

Figure 3.39. : Analyses par ACP des profils bactériens (ADNr 16S) obtenus par analyse DGGE de bananes **(A)** de Martinique et **(B)** de République Dominique, issues de différents modes de production.

Figure 3.40. : Graphiques des corrélations générées par l'analyse discriminante PLS.

Figure 3.41. : Analyse des données DGGE sur ADN bactériens par régression PLS.

Figure 3.42. : Profils DGGE d'ADNr bactériens (ADNr 16S) de bananes issues de différents modes de production.

Figure 3.43. : Analyse des données DGGE sur ADN bactériens par régression PLS.

Figure 3.44. : Courbes de fusion obtenues par HRM pour l'analyse de la richesse fongique présente à la surface des bananes **(A)** CIRAD925 **(B)** CB et **(C)** CC.

Liste des abréviations



| | |
|-----------------|--|
| A | Adénine |
| AB | Agriculture Biologique |
| ACP | Analyse en Composantes Principales |
| ACV | Analyse du Cycle de Vie |
| ADN(r/c) | Acide désoxyribonucléique (ribosomique/complémentaire) |
| AFSSA | Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments |
| ANOVA | ANalysis Of VAriance |
| ANSES | Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail |
| AOC | Appellation d'Origine Contrôlée |
| AOP | Appellation d'Origine Protégée |
| ARN(r/m) | Acide ribonucléique (ribosomique/messenger) |
| ARDRA | Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis |
| ARISA | Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis |
| Bio | Biologique |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| CB | Cavendish et non-traitée |
| CC | Cavendish et traitée |
| CE | Commission Européenne |
| CGAAER | Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux |
| CIRAD | Centre International de la Recherche Agronomique pour le Développement |
| COFRAC | Comité français d'accréditation |
| Conv. | Conventionnel |
| Cp | Crossing Point |
| Ct | Cycle Threshold |
| CTAB | Acetyl Trimethyl Ammonium Bromide |
| CTIFL | Centre Technique Interprofessionnel Fruits Légumes |
| DGCCRF | Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes |
| DGGE | Denaturing Gradient Gel Electrophoresis |
| dATP | Désoxyribose adénine triphosphate |

| | |
|---------------|---|
| dCTP | Désoxyribose cytosine triphosphate |
| dGTP | Désoxyribose guanine triphosphate |
| dTTT | Désoxyribose thymidine triphosphate |
| dNTP | Ensemble de : dATP + dCTP + dGTP + dTTT |
| DO | Densité Optique |
| EA | European cooperation for Accreditation |
| EARL | Exploitation agricole à responsabilité limitée |
| EDTA | Ethylène diamine tétra-acétate |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| FAO | Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture |
| FC | Flow Cell |
| FERA | Food and Environment Research Agency |
| FRET | Fluorescence Resonance Energy Transfert |
| GC | Guanine et Cytosine |
| H | Hydrogène |
| ha | Hectares |
| HACCP | Hazard Analysis Critical Control Point |
| HCL | Acide chlorhydrique |
| HRM | High Resolution Melting |
| IAF | International Accreditation Forum |
| IFOAM | International Foundation for Organic Agriculture |
| ILAC | International Laboratory Accreditation Co-operation |
| IGP | Indication Géographique Protégée |
| INAO | Institut National de l'Origine et de la qualité |
| INI | Procédure d'initiative |
| INRA | Institut National de la Recherche Agronomique |
| INSERM | Institut national de la santé et de la recherche médicale |
| IRMS | Isotope Ratio Mass Spectrometry |
| ISO | International Organization for Standardization |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| Kb | Kilobase |
| LOA | Loi d'Orientation Agricole |
| LV | Latent Variable |
| M | Molarité |

| | |
|-----------------------|--|
| MEGA | Molecular Evolutionary Genetics Analysis |
| MEGAN | MEta Genome ANalyzer |
| MLA | MultiLateral Agreement |
| MRA | Mutual Recognition Arrangement |
| NA₂ | Disodium |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NED | Nutrition et Ecosystèmes Digestifs |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| NIRS | Near-infrared spectroscopy |
| OGM | Organismes Génétiques Modifiés |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| OTU | Unité Opérationnelle Taxonomique |
| PAC | Politique Agricole Commune |
| PacBio | Pacific Biosciences |
| pb | Paire de bases |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PCRDT | Programmes-cadre pour la recherche et le développement technologique |
| PDO | Protected Designation of Origin |
| PFGE | Pulse Field Gel Electrophoresis |
| PLS-DA | Partial Least Square-Discriminant Analysis |
| pH | Potentiel hydrogène |
| PR | Position Relative |
| PRP | Programmes prérequis |
| p/v | Masse sur volume |
| QIIME | Quantitative Insights Into Microbial Ecology |
| qPCR | Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| RAPD | Randomly Amplified Polymorphic DNA |
| RDP | Ribosomal Database Project |
| Rf | Relative front |
| RFLP | Restriction Fragments Length Polymorphism |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| rtPCR | Real Time Polymerase Chain Reaction |
| SAU | Surface Agricole Utile |
| SBS | Sequencing by Synthesis |

| | |
|---------------|--|
| SDS | Dodécylsulfate de sodium |
| SGD | Saccharomyces Genome Database |
| SOLiD | Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection |
| SSCP | Single-Stranded Conformation Polymorphism |
| STG | Spécialité Traditionnelle Garantie |
| T | Thymine |
| T-RFLP | Terminal RFLP |
| TAE | Tampon Tris Acétate EDTA |
| TE | Tampon Tris EDTA |
| Temed | N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylenediamine |
| TGGE | Temperature Gradient Gel Electrophoresis |
| Tm | Température de fusion |
| Tris | Tris hydroxyméthyl aminométhane |
| UE | Union Européenne |
| UMR | Unité Mixte de Recherche |
| UPGMA | Unweigthed Pair-wise Grouping with Mathematic Averages |
| USA | United States of America |
| UV | Ultraviolet |
| v /v | volume /volume |
| vs | versus |
| VIP | Variable Importance in Projection |

Table des matières



| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 4 |
| 1.1. L'AGRICULTURE BIOLOGIQUE EN FRANCE ET EN EUROPE | 4 |
| 1.1.1. L'histoire de l'agriculture biologique | 4 |
| 1.1.2. L'agriculture biologique, qu'est-ce que c'est ? | 6 |
| <i>1.1.2.1. Définition</i> | <i>6</i> |
| <i>1.1.2.2. Un label avec une réglementation à plusieurs échelles</i> | <i>7</i> |
| <i>1.1.2.3. La conversion à l'agriculture biologique</i> | <i>9</i> |
| <i>1.1.2.4. Derrière les logos de l'agriculture biologique : l'« Eurofeuille » et le label français</i> | <i>12</i> |
| <i>1.1.2.5. La rapide progression de la production biologique en Europe et en France</i> | <i>13</i> |
| 1.1.3. Les enjeux de l'agriculture biologique pour l'environnement et pour la santé | 16 |
| <i>1.1.3.1. L'agriculture biologique, un service pour l'environnement ?</i> | <i>16</i> |
| <i>1.1.3.2. L'agriculture biologique, synonyme de santé ?</i> | <i>17</i> |
| <i>1.1.3.3. La complexité d'un système agricole qui peut encore progresser</i> | <i>19</i> |
| 1.2. LA TRAÇABILITÉ ET L'AUTHENTICITÉ POUR ASSURER LA SÛRETÉ ALIMENTAIRE | 21 |
| 1.2.1. Généralités | 21 |
| <i>1.2.1.1. La sûreté alimentaire par la traçabilité</i> | <i>22</i> |
| <i>1.2.1.2. Garantir l'authenticité des aliments pour lutter contre la fraude alimentaire</i> | <i>25</i> |
| 1.2.2. Les outils analytiques pour assurer la traçabilité et garantir l'authenticité des aliments | 27 |
| <i>1.2.2.1. Généralités</i> | <i>27</i> |
| <i>1.2.2.2. Application aux aliments issus de l'agriculture biologique</i> | <i>29</i> |
| <i>1.2.2.3. Les marqueurs d'authenticité</i> | <i>30</i> |
| 1.3. COMMENT DÉCRIRE ET ÉTUDIER UN ÉCOSYSTÈME MICROBIEN | 32 |
| 1.3.1. La flore microbienne des fruits | 32 |
| 1.3.2. L'analyse moléculaire pour l'étude de communautés microbiennes | 35 |
| <i>1.3.2.1. De l'approche traditionnelle à la métagénomique</i> | <i>35</i> |
| <i>1.3.2.2. Les techniques d'empreinte moléculaire</i> | <i>36</i> |
| <i>1.3.2.3. Les marqueurs moléculaires d'ADN microbiens</i> | <i>37</i> |
| <i>1.3.2.4. La PCR-DGGE : principe et applications</i> | <i>39</i> |
| <i>1.3.2.5. La PCR quantitative en temps réel (qPCR) couplée à la HRM</i> | <i>42</i> |
| <i>1.3.2.6. Les technologies de séquençage à haut débit</i> | <i>45</i> |

| | |
|---|-----------|
| 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES..... | 48 |
| 2.1. MATÉRIELS BIOLOGIQUES | 48 |
| 2.1.1. Souches microbiennes utilisées durant cette étude | 48 |
| 2.1.2. Échantillonnage de fruits | 48 |
| 2.1.2.1. <i>Les pommes</i> | 49 |
| 2.1.2.2. <i>Les pêches et nectarines.....</i> | 51 |
| 2.1.2.3. <i>Les bananes</i> | 52 |
| 2.1.3. Les différents types de traitements phytosanitaires appliqués aux fruits étudiés..... | 56 |
| 2.1.3.1. <i>Les pommes</i> | 57 |
| 2.1.3.2. <i>Les pêches et nectarines.....</i> | 59 |
| 2.1.3.3. <i>Les bananes</i> | 59 |
| 2.2. DU FRUIT À SON ÉCOSYSTÈME MICROBIEN..... | 62 |
| 2.2.1. Extractions de l'ADN total..... | 62 |
| 2.2.1.1. <i>Méthode d'extraction d'ADN par phénol/chloroforme développée en interne.....</i> | 62 |
| 2.2.1.2. <i>Utilisation d'un kit d'extraction d'ADN.....</i> | 63 |
| 2.2.1.3. <i>Tests de conservation des échantillons avant extraction des ADN.....</i> | 64 |
| 2.2.2. Contrôle de la pureté et dosage des ADN extraits | 64 |
| 2.2.3. Amplification par PCR et les techniques associées..... | 65 |
| 2.2.3.1. <i>Amplification par PCR en point final.....</i> | 65 |
| 2.2.3.2. <i>L'Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE).....</i> | 67 |
| 2.2.3.3. <i>Amplification par PCR quantitative en temps réel.....</i> | 74 |
| 2.2.3.4. <i>Analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM)</i> | 77 |
| 2.2.3.5. <i>Séquençage à haut débit : la méthode Illumina</i> | 77 |
| 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION | 80 |
| 3.1 COMPARAISON DES PROTOCOLES ET DES MODALITÉS D'EXTRACTION DES ADN GÉNOMIQUES | 80 |
| 3.1.1. Est-il possible de conserver les échantillons avant les étapes d'extraction ?..... | 80 |
| 3.1.2. Comparaison des protocoles d'extraction d'ADN génomiques (microbiens) à partir de fruits..... | 83 |
| 3.1.3. Conclusion | 88 |
| 3.2. UTILISATION DE L'ÉCOSYSTÈME MICROBIEN POUR LA DISCRIMINATION DES FRUITS EN FONCTION DE LEUR MODE DE PRODUCTION : EXEMPLE DE LA POMME..... | 90 |
| 3.2.1. Étude comparative des communautés microbiennes de pommes en fonction des modes de production | 91 |
| 3.2.1.1. <i>Comparaison des empreintes globales fongiques</i> | 92 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.1.2. Comparaison des empreintes globales bactériennes | 101 |
| 3.2.2. Conclusion | 109 |
| 3.3. CARACTÉRISATION DES VARIATIONS DE LA FLORE MICROBIENNE DES POMMES BIOLOGIQUES ET CONVENTIONNELLES | 112 |
| 3.3.1. De la vision globale de la diversité microbienne retrouvée à la surface des pommes... | 112 |
| 3.3.1.1. Estimation de la diversité microbienne associée au pommes..... | 112 |
| 3.3.1.3. Étude de l'abondance microbienne associée aux pommes..... | 121 |
| 3.3.1.4. Étude de la richesse microbienne associée aux pommes | 132 |
| 3.3.1.5. Conclusion partielle | 140 |
| 3.3.2. ...vers l'identification des marqueurs ADN microbiens pour la discrimination | 140 |
| 3.3.2.1. Identification des marqueurs ADN microbiens discriminants | 140 |
| 3.3.2.2. Conclusion partielle | 145 |
| 3.3.2.3. Application du séquençage ADN à haut débit..... | 145 |
| 3.3.3. Conclusion | 151 |
| 3.4. APPLICATION À D'AUTRES FRUITS | 153 |
| 3.4.1. Discrimination des pêches et des nectarines en fonction de leur mode de production | 153 |
| 3.4.1.1. Étude de l'empreinte génétique de la flore fongique de pêches et de nectarines..... | 153 |
| 3.4.1.2. Étude de l'empreinte génétique de la flore bactérienne de pêches et de nectarines . | 156 |
| 3.4.2. Discrimination des bananes en fonction de leur mode de production | 163 |
| 3.4.3. Conclusion | 174 |
| 4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES | 173 |
| VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE | 179 |
| ANNEXES | 182 |
| REFERENCES | 186 |

Introduction



Il faudra attendre les années 90 pour que le terme « agriculture biologique » soit officiellement reconnu en Europe (**CE n°2092/91 du Conseil du 24 juin 1991**). Ce mode de production est défini comme étant une agriculture qui contribue au respect de l'environnement et des animaux par un ensemble de pratiques agricoles spécifiques. Ces dernières se caractérisent par la non-utilisation de produits chimiques et d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM), le recours à la lutte biologique ou encore le recyclage des matières organiques (**définition selon l'Agence BIO**). L'AB est encadrée par une réglementation européenne qui définit les principes à respecter en terme de production, de préparation et d'importation, les listes positives de produits phytosanitaires utilisables, les pratiques pour chaque type d'élevage et les principes de contrôle, de certification, de sanction et d'étiquetage (**Règlements CE 834/2007 et 203/2012**). Le droit de commercialiser des produits avec la mention « agriculture biologique » est obtenu à l'issue d'une période de conversion des terres de deux ou trois ans et/ou d'une période de conversion des animaux variable selon les espèces. Au cours de cette période (et tout au long de la filière), les opérateurs de l'AB respectent un cahier des charges rigoureux qui privilégie les procédés non polluants et respectueux de l'écosystème (**Lairon, 2010**). La marque AB est donc un label de qualité (au même titre que les autres labels français comme AOC¹, STG², ou encore le Label Rouge) et répond à la demande des consommateurs en terme de traçabilité et de qualité alimentaire. Mais la crédibilité de ces labels est remise en cause par le consommateur qui, face aux différentes crises alimentaires, telles que « la vache folle », ou encore la récente affaire de la fraude à la viande de cheval, devient de plus en plus méfiant vis-à-vis des produits qu'il achète. Ainsi, le besoin d'assurer la traçabilité et l'authenticité des aliments se fait de plus en plus ressentir et est devenu un sujet émergent dans le secteur agroalimentaire. Ce besoin est d'autant plus d'actualité qu'il est alimenté par la recrudescence des cas d'étiquetage et/ou d'ingrédients frauduleux de denrées alimentaires. Ces fraudes sont motivées par le prix des produits labélisés qui est plus élevé que celui des produits sans label(s). Face à ce constat et dans le cadre de la mondialisation, la réglementation européenne relative à la qualité sanitaire des produits alimentaires s'est renforcée. La réglementation européenne n°178/2002, appliquée le 1^{er} janvier 2005, impose aux entreprises agroalimentaires de

¹ Appellation d'Origine Contrôlée

² Spécialité Traditionnelle Garantie

l'Union Européenne (UE) de tenir informés les consommateurs des problèmes sanitaires et de la nature du produit (**Article 10 du Règlement CE 178/2002**). Mais les systèmes actuels sont principalement administratifs, et les fraudes sont de plus en plus sophistiquées pour contourner au mieux les contrôles : elles sont donc de plus en plus difficiles à détecter par des analyses classiques. Les aliments biologiques (ou « bio ») font d'ailleurs partie des dix types d'aliments qui risquent le plus de faire l'objet de fraudes (**Commission européenne, 2013**). Il est donc nécessaire de recourir à des techniques analytiques avancées pour détecter les produits non-conformes. D'où l'intérêt de notre étude qui avait pour objectif de mesurer l'impact des pratiques agricoles sur la microflore (bactérienne et fongique) des aliments pouvant servir de base à la mise au point d'un outil performant permettant d'authentifier rapidement et à faible coût les aliments issus de l'AB. Car, à ce jour, aucune technique analytique ne permet de les discriminer.

Pour répondre à cet objectif, nous nous sommes basés sur l'hypothèse qui consistait à dire qu'il existerait des différences mesurables entre les produits issus de l'AB et les autres types d'agriculture en termes d'écosystème microbien. Autrement dit, que la flore microbienne des aliments serait influencée par deux facteurs principaux, que sont :

- 🌱 L'environnement naturel de l'aliment, qui dépend directement du lieu de production.
- 🌱 L'intervention humaine, incluant principalement la manipulation et le mode de production (traitements appliqués à la culture). En effet, dans l'AB, la flore microbienne du sol est renforcée par l'utilisation de produits phytosanitaires biologiques, ainsi que par l'interdiction des engrais de synthèse et d'OGM. Les fertilisants organiques apportent des bactéries issues des élevages animaux qui enrichissent la microflore déjà présente. Les traitements de protection avec les insecticides biologiques (tel que *Bacillus thuringiensis*) doivent également modifier la microflore de façon importante.

Afin de tester cette hypothèse et de vérifier si les pratiques agricoles ont un impact mesurable sur l'environnement microbien des aliments, nous avons dans un premier temps employé la PCR-DGGE, un outil d'empreinte moléculaire dont l'applicabilité a été démontrée au cours de recherches sur divers aliments au sein de l'équipe « Maîtrise des contaminants de la chaîne alimentaire » de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) Qualisud (**Doan et al, 2008 ; El Sheikha et al., 2009 ; Tatsadjieu et al, 2010 ; Hamdouche et al., 2015**). Ces études ont

permis de démontrer qu'il existait un lien entre l'origine géographique des aliments et la composition de leur communauté microbienne, et qu'il était aussi possible de mesurer l'impact de traitements post-récoltes sur cette communauté (effet de la fermentation et du séchage du cacao ou du café sur les communautés fongiques et bactériennes). La répétabilité et la sensibilité de cette méthode ont également été démontrées (**Le Nguyen, 2008 ; El Sheikha, 2010 ; Durand, 2012 ; Hamdouche, 2015**). Nous avons donc appliqué cette approche dans le contexte de notre étude. Les questions de recherche qui nous ont amenées à réaliser ces travaux sont les suivantes :

- 🏡 Les traitements agricoles appliqués au champ influencent-ils l'écosystème microbien des aliments ?
- 🏡 Est-il possible de mesurer l'impact des pratiques agricoles sur la flore microbienne des aliments ?
- 🏡 Existe-t-il des marqueurs microbiens discriminants qui permettraient d'assurer d'authentifier les aliments bio ?

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à l'état de l'art sur l'AB, la traçabilité et l'authenticité des aliments, ainsi que sur les moyens utilisés pour décrire et étudier l'écosystème microbien associé à une denrée alimentaire. Seront ensuite présentés les différents matériels et méthodes qui ont été utilisés afin de mener à bien ce projet de recherche. Les résultats obtenus durant ces trois années de thèse seront présentés sous la forme de quatre chapitres : le premier chapitre présentera les résultats des tests de conservation d'extraits d'ADN génomiques microbiens et la comparaison de deux méthodes d'extraction d'ADN (kit et extraction au phénol/chloroforme). Dans ce chapitre, nous proposerons un moyen de préparer et conserver les échantillons biologiques avant extractions des ADN génomiques microbiens pour l'analyse par PCR-DGGE. Le second chapitre traitera de l'étude de l'impact des traitements sur la flore microbienne globale (bactérienne et fongique) des pommes et la vérification de la robustesse de notre approche. Le troisième chapitre sera consacré à la caractérisation de cette flore microbienne afin d'enrichir les connaissances actuelles sur les communautés microbiennes des pommes et d'identifier des groupes microbiens potentiels pour la discrimination de celles qui sont issues de l'AB. Enfin, le dernier chapitre présentera l'application de notre approche à d'autres types de fruits pour vérifier sa robustesse.

1. Synthèse

bibliographique

-
-
-



1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. L'AGRICULTURE BIOLOGIQUE EN FRANCE ET EN EUROPE

1.1.1. L'histoire de l'agriculture biologique

Après la première guerre mondiale, mais surtout après 1945 en France et en Europe, un besoin urgent de se reconstruire et de nourrir un continent meurtri et ravagé s'est fait ressentir. Les industries ne pouvaient plus produire, trois millions d'hectares réservés à l'agriculture avaient été détruits... des dégâts matériels élevés à tel point que le rationnement de la population ne s'arrête qu'en 1949. L'agriculture française souffrait d'un grand retard et a dû faire face à la difficulté de pouvoir nourrir la population. Le but était de reconstruire la France agricole afin de produire plus : dans une situation de pénurie, voire de famine, c'est la quantité qui était visée. Une orientation productiviste de l'agriculture est mise en place avec l'aide de la PAC (Politique Agricole Commune), créée par la Commission Européenne en 1962 et qui a constitué la pierre angulaire de la politique alimentaire européenne (agriculture.gouv.fr).

Le modèle agricole développé après-guerre en France et en Europe s'est en effet basé sur une mécanisation et une intensification de l'agriculture, qui privilégiait l'utilisation massive d'intrants chimiques (pesticides, fertilisants). Il s'est également basé sur l'innovation variétale et la production de semences qui contribuaient à l'agriculture productiviste de l'époque. En effet, les variétés étaient sélectionnées pour valoriser les intrants chimiques (par exemple, la valorisation de l'azote par la rigidité des pailles et le nanisme), et la mécanisation (homogénéité variétale) (**Bonneuil *et al.*, 2006**).

Ce modèle agricole basé sur la combinaison des évolutions technologiques et scientifiques, renforcé par la « Révolution verte », a permis d'augmenter considérablement les rendements et d'éviter de nombreuses famines liées à la croissance démographique des années 1960-1970 pour ensuite atteindre l'autosuffisance alimentaire dès 1970. Ce modèle agricole intensif était par ailleurs considéré comme étant la solution à l'insécurité alimentaire. Mais, très rapidement, l'emploi non contrôlé des engrais a entraîné des déséquilibres (apparition de carences des sols ; réduction de la biodiversité ; perte de perméabilité des terres à l'air et l'eau...) et des mouvements sociaux en opposition à cette agriculture ont commencé à apparaître.

Le besoin de changer de système s'est fait de plus en plus ressentir par la naissance d'une prise de conscience en faveur du respect de l'environnement et le souhait d'une nouvelle qualité de vie. Cette prise de conscience s'est accentuée dans les années 70 avec les crises pétrolières et la conscience des limites des ressources de la planète en opposition avec l'agriculture productiviste caractérisée par sa forte consommation d'énergie fossile et par son caractère polluant. Sous l'impulsion de producteurs et de consommateurs, mais aussi de médecins et de nutritionnistes, l'AB s'est alors présentée comme une alternative. Mais les méthodes de l'AB ont mis du temps avant d'être adoptées et ont souvent été marginalisées, en particulier en France où l'application de ces méthodes revenait à s'opposer au principe général de progrès du fait que cela remettait en question les apports de l'industrialisation.

Il faut remonter plus loin pour connaître les origines de l'AB. En effet, plusieurs courants d'idées reposant sur des principes éthiques et écologiques ont contribué à la naissance de ce mode de production (**Besson, 2007**). Les principaux étant : i) les travaux de l'autrichien Steiner sur l'agriculture biodynamique basés sur l'emploi de biostimulants (substances végétales et minérales) et le compostage avec la prise en compte des forces telluriques et cosmiques dans les pratiques agricoles (système ayant entraîné la création du label Demeter³ en 1928, pour la distribution de produits biodynamiques), ii) également, les travaux d'Howard sur l'agriculture organique (en Grande Bretagne) basés sur la fertilité des sols par l'utilisation de l'humus, iii) ceux de Rusch et Muller (en Suisse) sur la fertilité de la terre et les circuits courts et enfin iv) le quatrième courant est celui de l'agriculture naturelle ou « sauvage » de Mr Fukuoka (Japon). En France, il faudra attendre les années 50 pour que les courants d'idées contre l'agriculture chimique apparaissent grâce à différents acteurs (agronomes, médecins, agriculteurs et même consommateurs).

Deux mouvements se sont dessinés : un mouvement associatif d'agriculteurs et de consommateurs (création de l'association Nature et Progrès⁴ en 1964) et un mouvement agricole lié aux activités économiques (méthode Lemaire-Boucher qui développa des

³ Marque de certification de produits issus de l'agriculture biodynamique (les produits composés doivent comporter au moins 90% d'ingrédients certifiés Demeter).

⁴ Association qui regroupe des producteurs, des transformateurs et des consommateurs. La mention Nature et Progrès respecte une charte et des cahiers des charges techniques plus contraignants que ceux des autres labels d'agriculture biologique (les produits composés doivent comporter au moins 70% conformes à la charte Nature et Progrès et ils ont cinq ans pour atteindre les 100%).

techniques basées sur le compost et l'utilisation du lithothamme⁵) (**Agence BIO**⁶).

Dans tous les cas, ces courants d'idées avaient en commun la volonté de remettre en cause les effets de l'agriculture dite chimique ou industrielle/intensive sur l'environnement et sur la santé. Mais cela allait à l'encontre des progrès de la chimie et donc de l'industrialisation (et plus largement de la société) qui a contribué à l'agriculture productiviste de l'époque après-guerre. Cette agriculture intensive s'était imposée comme solution pour nourrir une population en forte expansion et pour un coût moindre. C'est pourquoi l'AB était passée inaperçue à cette époque où la nécessité de manger à sa faim passait avant la volonté de manger des aliments issus d'une agriculture respectueuse de l'environnement.

Il a fallu en effet attendre les années 1980 pour que l'AB soit reconnue par les pouvoirs publics français, via le logo AB (créé en 1985), qu'elle sorte de sa marginalité et connaisse un véritable essor. À cette période, l'AB faisait l'objet de cahiers des charges nationaux avant d'être régie au plan européen en 1991 (**Règlement CE n° 2092/91 du Conseil du 24 juin**).

1.1.2. L'agriculture biologique, qu'est-ce que c'est ?

1.1.2.1. Définition

Reconnue depuis 1999 par le *Codex Alimentarius*⁷ qui la définit comme étant « un système de gestion holistique de la production qui favorise la santé de l'agro-système, c'est-à-dire le maintien de la biodiversité, le respect des cycles biologiques et de la vie du sol, des plantes, des animaux et des humains », l'AB s'oppose à l'agriculture conventionnelle dite « chimique ».

Autrement dit, l'AB garantit la production d'aliments issus d'une agriculture respectueuse de l'environnement, écologiques, durables et équitables, en harmonie avec la biodiversité et l'environnement par l'utilisation d'intrants extrêmement contrôlés. La

⁵ Algue marine calcaire, récoltée en Bretagne (du côté des Glénans). Peut s'utiliser comme amendement calcaire et comme engrais.

⁶ « Plateforme nationale d'information et d'actions pour le développement de l'agriculture biologique en France ».

⁷ Le *Codex Alimentarius* est un programme qui a été créé en 1963 par la FAO et l'OMS et qui compile l'ensemble des normes alimentaires internationales, des lignes directives et codes d'usages qui contribuent à la sécurité, la qualité et l'équité du commerce international des aliments.

réglementation qui régit ce mode de production interdit l'emploi d'intrants de synthèse (hormis ceux mentionnés dans une liste positive), tels que les engrais ou les pesticides chimiques mais aussi les antibiotiques et les OGM. En effet, elle favorise des pratiques agricoles respectueuses des équilibres naturels écologiques pour entretenir la biodiversité animale et végétale (recyclage et apport de matière organique d'origine animale et/ou végétale, utilisation de plantes de couverture, rotations longues des cultures, lutte biologique...).

La marque AB, tout comme les autres signes officiels (tels que AOC, IGP, STG, Label Rouge...), est un label de qualité d'un produit. Elle est en effet soumise à une réglementation spécifique dont les applications sont contrôlées par des organismes de certification agréés par les pouvoirs publics. Les agriculteurs ayant opté pour ce mode de production doivent donc respecter les cahiers des charges et les normes qui lui sont associés pour pouvoir vendre des produits sous la mention « bio ». Ces cahiers des charges, différents d'un pays à l'autre, ont été harmonisés au niveau européen. Par ailleurs, la réglementation en AB ne s'applique qu'aux produits agricoles, elle n'est pas adaptée pour les produits non agricoles et non alimentaires pour lesquels il existe des cahiers des charges spécifiques (pour les produits cosmétiques ou les textiles par exemple).

1.1.2.2. Un label avec une réglementation à plusieurs échelles

Si les principes de l'AB ont été introduits en France après la Seconde Guerre Mondiale, sa première officialisation remonte à la Loi d'Orientation Agricole (LOA) de 1980 (**Art 14 III de la Loi d'orientation agricole du 4 juillet 1980**) : « Les cahiers des charges définissant les conditions de production de l'agriculture n'utilisant pas de produit chimique de synthèse peuvent être homologués par arrêté du Ministère de l'Agriculture ». Il faudra cependant attendre 1991 pour que le premier règlement européen sur les productions végétales biologiques soit publié et que le terme "agriculture biologique" soit officiellement reconnu (**CE n°2092/91 du Conseil du 24 juin 1991**) dans le cadre de la réforme de la PAC. Pour les productions animales, la base juridique est constituée par le règlement CE n°1804/99 datant de 1999. Jusqu'à l'apparition de ces règlements, la qualité définie pour le consommateur était assurée par des cahiers des charges, gérés par des organismes privés, qui servaient de garantie et de contrôle en attendant que les règles de production soient harmonisées. En 1972, le premier cahier des charges français (et au monde) qui décrit les règles de conduite d'une agriculture dite « biologique » est présenté par Nature et Progrès.

Dans la même année, durant le Congrès de Versailles réunissant ses partenaires mondiaux (dont la « Soil Association » de Grande Bretagne), l'organisation internationale des acteurs de l'AB a été créée sous le nom d'IFOAM (Fédération Internationale des Mouvements d'Agriculture Biologique) afin de regrouper les principales organisations nationales d'agriculture biologique dans le monde en une seule fédération. Le cahier des charges servira alors de référence au niveau mondial en tant que normes minimales que doivent respecter toutes les organisations adhérentes.

Aujourd'hui, et depuis le 1^{er} janvier 2009, l'AB est encadrée par le règlement (CE) n°834/2007 qui abroge et remplace le règlement (CE) n°2092/91. Ce nouveau règlement précise l'ensemble des règles à suivre concernant les conditions et principes de production, de transformation, de distribution, d'importation, de contrôle et d'étiquetage des produits bio. Des règlements d'application viennent le compléter, notamment le règlement (CE) n°889/2008 relatif à la production bio, aux règles d'étiquetage et de contrôles. Ces règles sont régulièrement révisées afin d'être adaptées pour que le secteur puisse continuer à se développer. Dans le but d'aider et accompagner les organismes certificateurs et les structures de développement de l'AB, des guides (qui n'ont aucune valeur juridique) ont été rédigés par l'Institut National de l'Origine et de la qualité (INAO⁸) pour l'application des règlements (CE) n°834/2007 et (CE) n°889/2008 (**Agence BIO**).

Ces nouvelles réglementations européennes ont conduit à une harmonisation des règlements concernant l'AB, avec l'aide de l'IFOAM et du *Codex Alimentarius* essentiellement. Cette harmonisation a amené des débats remettant en cause la qualité des produits bio européens. En effet, la législation liée à l'AB est considérée comme étant moins exigeante que certaines dispositions nationales (notamment celles qui ont été mises en place en France concernant les OGM⁹), et donc elle amènerait la qualité de certains produits bio à être tirée vers le bas. Cela a entraîné des réticences lors de la mise en place des règles harmonisées. Mais malgré ces réticences, l'harmonisation des règles en un cadre réglementaire européen a été bénéfique pour le secteur du bio puisqu'il a permis à ce secteur

⁸ « Établissement public administratif, doté de la personnalité civile, sous tutelle du Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt » (**inao.gouv.fr**).

⁹ Le Règlement Européen 834/2007 autorise la présence « fortuite ou techniquement inévitable » d'OGM à hauteur de 0,9% dans les produits bio. Au-delà de ce seuil, le produit doit être étiqueté OGM selon le règlement (CE) n°1829/2003.

de devenir l'un des plus dynamiques de l'agriculture européenne, avec un doublement des surfaces agricoles bio depuis 2004 (**Agence BIO ; cf. partie 1.1.2.5**).

Les cahiers des charges nationaux publics et privés existent toujours à l'heure actuelle et peuvent compléter au besoin le règlement CE n°834/2007 et apporter des garanties supplémentaires, même s'ils ne se substituent pas à ce dernier (certaines productions ne font pas l'objet d'une harmonisation européenne¹⁰). Les cahiers des charges provenant d'organismes privés, tels que Nature et Progrès ou Demeter par exemple, doivent respecter la réglementation (européenne et/ou française) pour pouvoir faire référence au terme biologique. Certains opérateurs choisissent de suivre les deux types de cahiers des charges.

Ainsi, les règles qui définissent et contrôlent l'AB sont situées sur 3 échelles : l'échelle de l'UE, l'échelle nationale et l'échelle globale avec les règles standards de l'INAO et les définitions du *Codex Alimentarius*. Les directives du *Codex Alimentarius* et de l'INAO sont des normes minimales pour l'AB, destinées à guider les gouvernements et les organismes de certification et sont internationalement reconnues.

1.1.2.3. La conversion à l'agriculture biologique

Un des éléments déterminant pour pouvoir bénéficier de la mention « agriculture biologique » est la réalisation d'une période de conversion¹¹ qui est nécessaire entre le mode de production conventionnel et le mode de production bio. Le choix de la race animale ou de l'espèce végétale pour la conversion à l'AB n'est pas limité, mais il doit être réfléchi : il faut tenir compte de la capacité des cultures et/ou des animaux à s'adapter aux conditions du milieu (en privilégiant les races et souches autochtones), de leur vitalité et de leur résistance aux maladies afin d'éviter tout problème sanitaire.

Durant cette période, tout le système de production doit être conduit en AB sans possibilité pour le producteur de commercialiser les produits sous le terme « biologique ». Il est cependant possible de bénéficier de la mention « en conversion vers l'agriculture biologique » à partir de la deuxième année. Un organisme certificateur indépendant et privé contrôle régulièrement cette conversion, et donc la conformité des pratiques selon la

¹⁰ Par exemple, les aliments pour animaux de compagnie.

¹¹ De 2 à 3 ans pour les cultures et de 6 semaines à 1 an selon les espèces pour les animaux.

réglementation en vigueur pour l'AB, et ce dès la première année de conversion. Le choix de l'organisme certificateur revient au producteur sur la base de plusieurs critères (coût, proximité, notoriété...). À noter que, sous certaines conditions, la mixité bio/non bio est autorisée et qu'un plan de contrôle renforcé peut être mis en œuvre par l'organisme certificateur.

1.1.2.3.1. Les organismes certificateurs et les contrôles

Une fois que l'opérateur aura procédé à la notification de son activité et choisi l'organisme certificateur parmi ceux agréés (en France par l'INAO, lui-même reconnu par le Comité français d'accréditation ou COFRAC¹² sur la base de la norme NF EN 45011), un contrat sera signé entre les deux et une visite d'habilitation sera effectuée. Des contrôles annuels, payés par l'opérateur, seront ensuite mis en place ainsi que des contrôles inopinés. Un certificat est délivré pour les produits jugés conformes. En cas de non-respect de la réglementation en vigueur (européenne et/ou nationale), des sanctions sont appliquées. Des contrôles et des analyses permettent de vérifier la conformité des produits en cas de doute sur la non utilisation de produits interdits (pesticides, OGM...).

Les organismes de contrôle et de certification se doivent de respecter les règles de la norme EN 45011 : indépendance, compétence, impartialité, efficacité. En France, les organismes de certification sont tous privés (**Figure 1.1.**) et agréés pour le contrôle des produits bio : Ecocert, Agrocet, Certipaq, Bureau Véritas Certification, Certisud, Certis, Bureau Alpes Contrôles et Qualisud. Si la production possède d'autres labels (une AOC par exemple), l'éleveur doit également se soumettre aux contrôles de l'INAO.

¹² Le COFRAC est reconnu officiellement à la fois au niveau national et international.

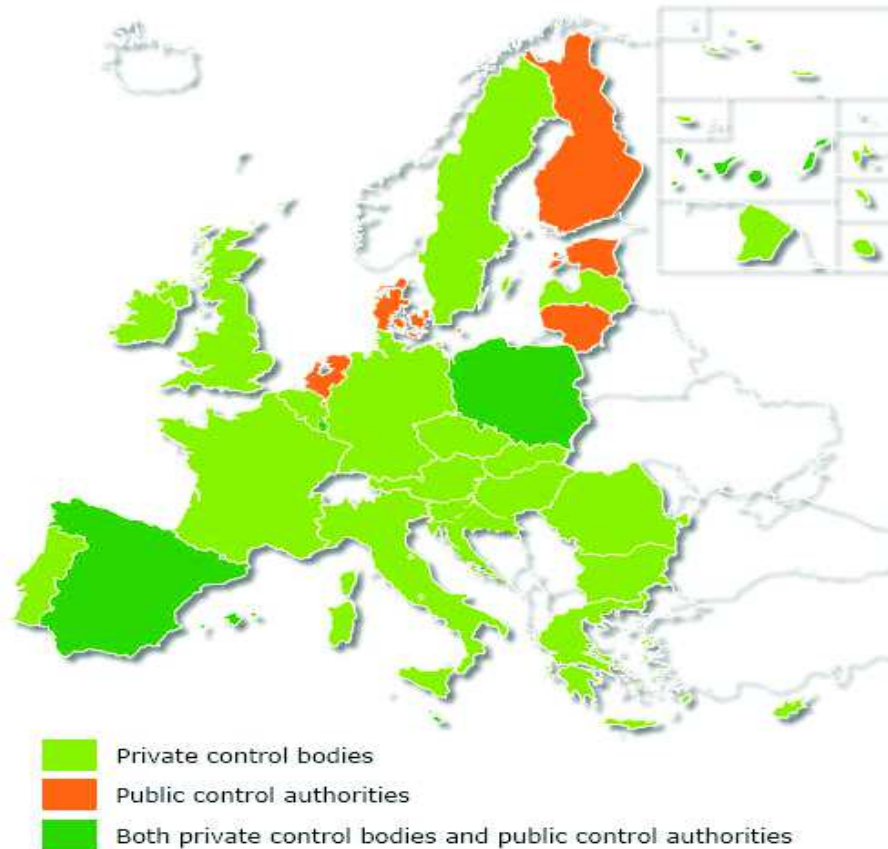


Figure 1.1. Les systèmes de contrôle Européens de la filière du bio.

Dans la majorité des pays membres, les organismes de contrôle et de certification du bio sont des organismes privés. Chaque État membre doit désigner une ou plusieurs autorités chargées des contrôles (généralement un département du Ministère de l'agriculture ou de la santé publique, en France l'INAO, la DGCCRF et le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt). Cette autorité compétente peut, soit déléguer tout ou une partie de ses tâches de contrôle à un ou plusieurs organismes de contrôle privés et/ou publics qu'il doit approuver et superviser, soit confier tout ou une partie de sa responsabilité de contrôle à une ou plusieurs autorités de contrôle publiques. Un système mixte (organismes de contrôle privés et publics) est également possible.

Source : <http://ec.europa.eu>

D'autres instances et autorités compétentes (AFSSA¹³, DGCCRF¹⁴, Commission Européenne, Services de la Direction Générale des Douanes...) peuvent s'ajouter à ces contrôles, que ce soit sur des produits (bio/conventionnels ou autres) ou sur les organismes de contrôle eux-mêmes. En effet, les pratiques d'un organisme de contrôle sont surveillées notamment par son comité de certification mais aussi par des audits de l'INAO et du COFRAC ou encore par la DGCCRF. Chaque année, les États membres rendent compte à la

¹³ Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, devenue ANSES en 2011.

¹⁴ Direction Générale de la Répression des Fraudes.

Commission européenne sur les résultats des contrôles effectués sur les opérateurs du bio et sur les mesures prises en cas de non-conformité. La Commission européenne supervise les États membres, afin qu'ils assument leurs responsabilités, sur la base de l'information apportée dans leurs rapports annuels et sur les vérifications qu'ils effectuent.

1.1.2.3.2. Les aides publiques disponibles

Dans le cadre de la PAC, des aides à la conversion mais également au maintien à l'AB sont proposées aux exploitants (attribuées par l'État ou les régions), ainsi que des crédits d'impôts. Pour pouvoir en bénéficier il est nécessaire d'avoir procédé au préalable à une notification qui précède la signature du contrat entre l'opérateur et l'organisme certificateur. Cette notification constitue une déclaration obligatoire définie par l'article 28 du règlement CE 834/2007. En France, elle est gérée depuis 2003 par l'Agence BIO pour le compte du Ministère de l'agriculture. Cette demande d'aides doit être renouvelée chaque année et engage le producteur à rester en mode de production bio pendant 5 ans (**Agence BIO**).

1.1.2.4. Derrière les logos de l'agriculture biologique : l'« Eurofeuille » et le label français

Largement diffusé par les médias, le logo officiel européen de l'AB (dit « Eurofeuille », **Figure 1.2.**) est rendu obligatoire depuis 2010 (règlement UE n°271/2010 de la Commission du 24 mars). Le logo permet de renforcer la protection des produits bio contre les imitations et les valoriser. Mais son objectif principal est de permettre aux consommateurs d'identifier rapidement et avec certitude les produits bio et de consolider leur confiance vis-à-vis de ces produits. En effet, le logo répond aux règles d'usage du bio selon le règlement qui l'encadre (CE n°834/2007) et garantit que les produits contiennent au moins 95% d'ingrédients certifiés comme étant bio. Les 5% restants doivent figurer sur une liste positive annexée au règlement cadre. En cas d'indisponibilité d'un ingrédient sous la forme bio, une autorisation temporaire peut être donnée. Le lieu de production et le numéro de code de l'organisme certificateur doivent systématiquement accompagner le logo, il est également possible de mentionner le pays (lorsqu'au moins 98% en poids des matières premières agricoles proviennent de ce pays). Des logos nationaux (par exemple le logo français AB) et privés peuvent également y figurer, mais de façon facultative (**Figure 1.2.**). Ils figurent seuls dans le cas où les produits ne sont conformes qu'aux cahiers des charges nationaux. Le/les logos ne peuvent être apposés qu'après certification par un organisme certificateur agréé. Il sera donc toujours assorti de la mention « Contrôlé ou Certifié par » suivi du nom de l'organisme certificateur.

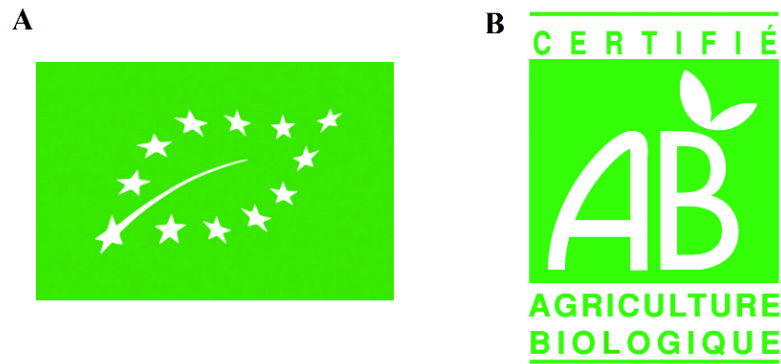


Figure 1.2. Logos officiels de l'agriculture biologique.

(A) Logo européen de « l'agriculture biologique » (« organic farming » en anglais) assurant le respect du règlement en vigueur de l'Union Européenne. Il symbolise le mariage de l'Europe (les étoiles dérivées du drapeau européen) avec la nature (la feuille stylisée et la couleur verte du logo).

(B) Exemple du logo national français AB. Créé en 1985, il est la propriété du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche qui en contrôle les conditions d'usage et le graphisme. Il répond aux mêmes conditions que le logo européen et n'est plus obligatoire. Il est cependant utilisable sur les productions qui ne sont couvertes que par les cahiers des charges français qui complètent la réglementation européenne notamment en ce qui concerne les escargots ou les aliments pour animaux de compagnie entre autres.

Le logo européen ne peut pas être utilisé dans les cas suivants :

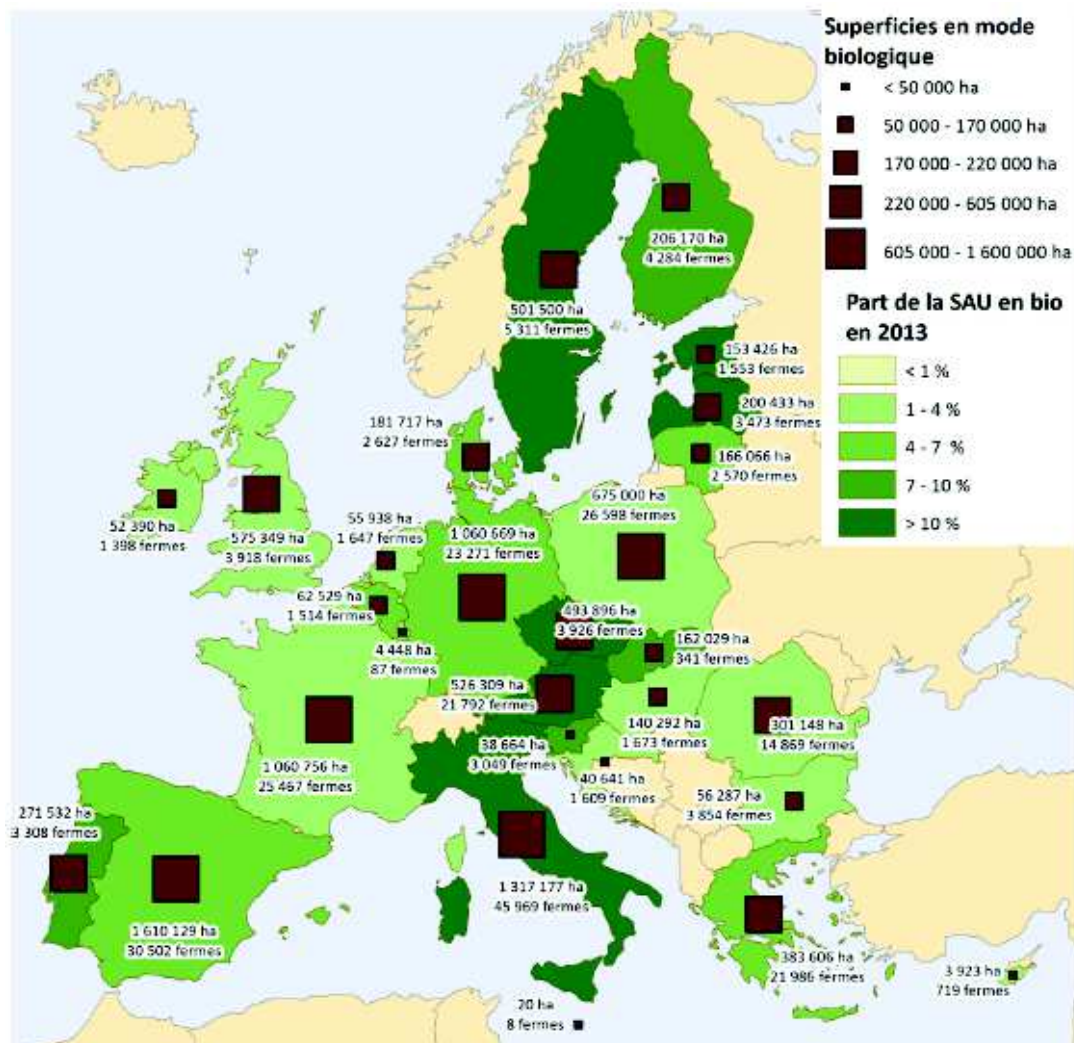
- 🇪🇺 Si les produits n'entrent pas dans le cadre de la législation européenne (comme les produits de chasse ou de pêche d'animaux sauvages, les cosmétiques et le textile),
- 🇪🇺 Si les produits contiennent moins de 95% d'ingrédients bio,
- 🇪🇺 Si les produits sont en conversion vers le bio.

1.1.2.5. La rapide progression de la production biologique en Europe et en France

Face à la demande croissante des consommateurs, le secteur de l'AB s'est rapidement développé durant les dernières décennies en Europe où la surface agricole bio a presque doublé depuis 2004. Fin 2013, celle-ci atteint 5,7% de la Surface Agricole Utile (SAU), soit 11,5 millions d'hectares (ha). Ceci représente une augmentation de 3% par rapport à 2012 (**Figure 1.3**). Très inégalement répartie, l'AB est majoritairement présente dans 4 pays de l'UE en terme de surfaces agricoles totales (ha) : l'Espagne, l'Italie, la France et l'Allemagne.

La production est diversifiée, et la demande peut être satisfaite dans une large mesure, même si les importations jouent un rôle important pour de nombreux pays (la France importe actuellement 25% des produits bio consommés, notamment des produits exotiques et d'épicerie). Cela s'applique non seulement pour les aliments qui ne peuvent pas être produits dans le pays, comme le café, le cacao ou les bananes, mais également pour les produits

domestiques tels que les céréales pour lesquelles certains pays (comme la France) ont une forte vocation naturelle, mais n'en produisent pas suffisamment. Les fruits bio occupent une place majeure dans le marché des produits alimentaires bio (l'Espagne et l'Italie étant les principaux pays producteurs). Les bananes et les pommes sont les plus populaires auprès des consommateurs européens.



Source : Agence BIO d'après différentes sources européennes – 2015
 Données 2013 pour tous les pays sauf : Chypre : 2012 et Malte : 2012 pour les surfaces et la part de la SAU

Figure 1.3. Représentation des superficies cultivées en bio (certifiées et en conversion), du nombre d'exploitations bio et de la part de la Surface Agricole Utile (SAU) totale en bio dans l'Union Européenne.

En France, selon les derniers chiffres de l'Agence BIO, l'AB connaît une période d'essor depuis 1995 (Figure 1.4.). Il s'en est suivi une stabilisation d'environ cinq ans, puis une nouvelle phase de croissance a commencé depuis 2008. Fin 2010, une augmentation de 25% du nombre d'exploitations agricoles engagées en AB est constatée par rapport à 2009 et

de 55% par rapport à 2008. Les exploitations bio représentaient 4% des exploitations agricoles en France. Aujourd'hui, plus d'un million d'ha sont engagés en AB, ce qui représente 5,7% des terres cultivées. La France est devenue, depuis 2014, la troisième surface agricole bio d'Europe derrière l'Espagne et l'Italie. Bien que les chiffres soient toujours éloignés d'un des objectifs du plan Ambition bio¹⁵, visant les 8% fin 2017, et que ce mode de production soit inégalement réparti (la moitié est concentrée dans 5 régions : Midi-Pyrénées, Pays de la Loire, Languedoc-Roussillon, Rhône-Alpes et Provence-Alpes-Côte d'Azur), ces résultats sont encourageants.

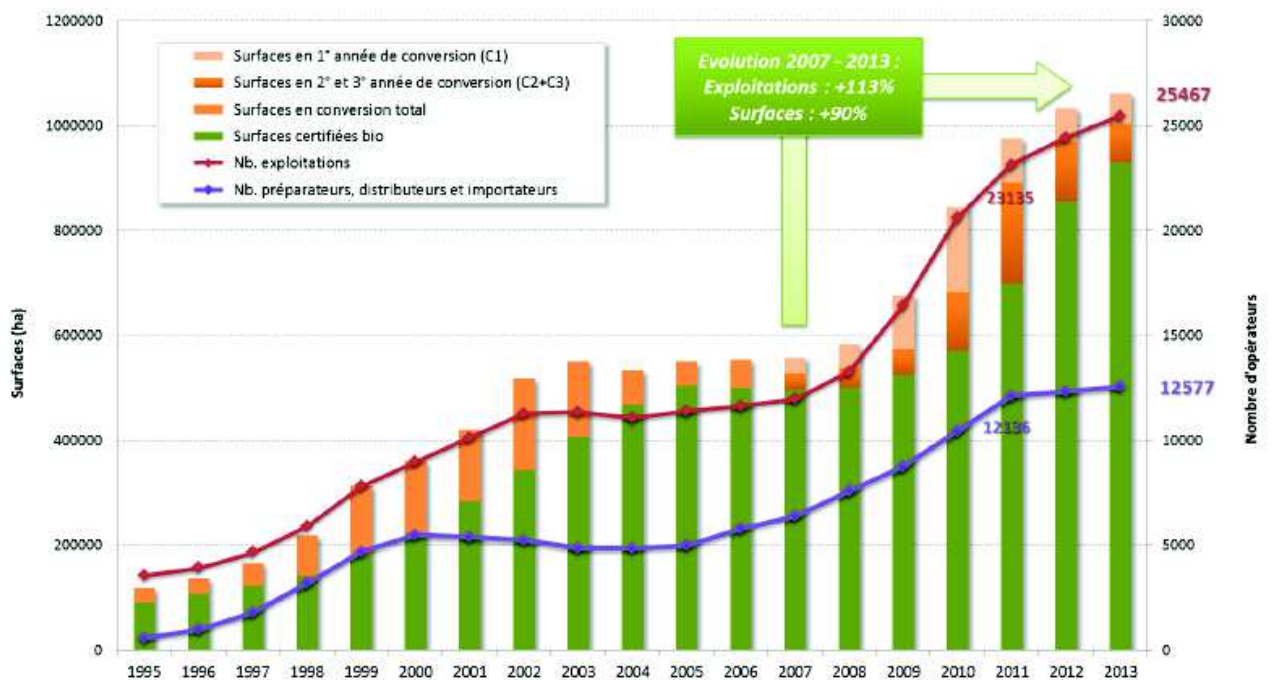


Figure 1.4. Évolution depuis 1995 du nombre de producteurs et autres opérateurs bio et des surfaces en mode de production biologique en France.

Source : Agence BIO.

Ainsi, même si ce secteur est très modeste d'un point de vue quantitatif il n'en reste pas moins devenu très dynamique en réponse aux demandes croissantes des consommateurs et des agriculteurs, qui expriment de plus en plus leur intérêt pour les produits bio. Les motivations qui les poussent à consommer ces aliments sont principalement justifiées par leur souci de préserver leur santé et l'environnement.

¹⁵ Programme national pour le développement de l'AB en France.

1.1.3. Les enjeux de l'agriculture biologique pour l'environnement et pour la santé

Les avantages de l'AB pour la biodiversité, l'environnement en général, la santé humaine et la sûreté alimentaire ont été intensément débattus au cours de ces dernières années (**Bengtsson et al., 2005 ; Hole et al., 2005 ; Badgley et al., 2007 ; Mondelaers et al., 2009 ; Reganold et al., 2010 ; Dobermann 2012 ; Tuomisto et al., 2012 ; Winqvist et al., 2012 ; Gabriel et al., 2013**). Pour pouvoir prévenir les maladies et les attaques de ravageurs, les agriculteurs bio doivent avoir recours à des pratiques qui se veulent respectueuses de l'environnement : pesticides d'origine naturelle, rotation des cultures pour entretenir la fertilité, la biodiversité et l'activité biologique des sols. L'AB peut-elle donc être une solution pour contribuer à la préservation de l'environnement ? Ces mesures contribuent-elles également à la santé du consommateur ?

1.1.3.1. L'agriculture biologique, un service pour l'environnement ?

De tous les pays d'Europe et du monde, la France est le plus mauvais élève et arrive première au classement des plus grands utilisateurs de pesticides. De nombreuses études démontrent la dangerosité de ces produits pour la santé (**Spiewak et al., 2001 ; Kishi et al., 2005 ; Karabelas et al., 2009 ; Guyton et al., 2015**). La forte dépendance de l'agriculture conventionnelle pour les engrais chimiques et pesticides (insecticides, fongicides, herbicides, parasitocides) a causé des dommages considérables sur l'environnement (**Gracia & de Magistris, 2008 ; Aldanondo-Ochoa & Almansa-Sáez, 2009**). Si bien que la réduction de l'emploi de pesticides dans l'agriculture est devenue une des préoccupations majeures de l'Union Européenne, en particulier de la France qui s'est engagée dans un plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides avec le Grenelle de l'environnement depuis 2006. Ces engagements se sont notamment orientés vers la réduction de moitié, d'ici 2020, de l'emploi de pesticides de synthèse (plan Ecophyto), notamment en orientant 20% de la surface agricole utile en AB. En effet, de nombreuses études et méta-analyses font ressortir que l'AB serait plus respectueuse de l'environnement et favoriserait la biodiversité (**Hole et al., 2005 ; Tuomisto et al., 2012 ; Tuck et al., 2014**). Différentes approches ont été appliquées afin de comparer les impacts des pratiques agricoles bio et conventionnelles sur la biodiversité et sur l'environnement. Certaines portaient sur les propriétés du sol et la qualité de l'eau, d'autres sur les éléments nutritifs comme l'azote ou encore sur l'étendue des terres agricoles utilisées. L'Analyse du Cycle de Vie (ACV) est couramment utilisée pour l'étude comparative de l'impact environnemental des différents modes de production (**Nemecek et al., 2011 ; Stone et al., 2012 ; Tuomisto et al., 2012**).

Certaines études soutiennent que la production bio à grande échelle occuperait de trop vastes terrains agricoles du fait des rendements moins importants qu'en agriculture conventionnelle (**Tuck et al., 2014**), ou encore sur la diversité de la faune et de la flore (**Bengtsson et al., 2005 ; Hole et al., 2005 ; Fuller et al., 2005 ; Rundlöf et al., 2008 ; Rahmann 2011**). Les résultats de ces études pris dans leur ensemble montrent que le niveau d'impact peut varier au sein d'un même système de production. En effet, l'impact environnemental varie d'un agriculteur à un autre, ou en fonction de la zone de production et du choix du circuit de distribution (**Tuck et al., 2014**). Il n'y a donc pas une seule AB ou une seule agriculture conventionnelle, mais une gamme de systèmes de production différents, avec un niveau d'impact sur l'environnement qui dépendra davantage du choix des agriculteurs de leur système d'exploitation bien que l'AB semble être une des pratiques agricoles présentant le moins d'impact environnemental global (**Tuck et al., 2014**).

1.1.3.2. L'agriculture biologique, synonyme de santé ?

« *Que ton aliment soit ton médicament, que ton médicament soit ton aliment* »

(Hippocrate, 460 - 370 avant JC)

Cette célèbre citation d'Hippocrate, bien qu'elle date du 5^{ème} siècle avant JC, s'applique toujours à notre époque où elle est encore plus d'actualité.

Les aliments sont essentiels pour notre santé, mais ils peuvent être également la source de certaines maladies. Les consommateurs en ont bien pris conscience, surtout depuis les différentes crises alimentaires. Mais, malgré le fait que nos aliments n'ont jamais été aussi sûrs, la surmédiatisation de ces crises alimentaires et les nombreux messages à connotation santé et diététique ont créé une cacophonie alimentaire (**Fischler, 1993**) qui a contribué à un immobilisme de nos comportements alimentaires. Si bien que le consommateur ne sait plus différencier l'info de l'intox et se crée lui-même sa propre vérité en fonction de ses croyances. Cette peur inconsciente étant indirectement favorisée par la réglementation UE 178/2002 qui impose de tenir informé les consommateurs en cas de problème sanitaire en utilisant les moyens les plus efficaces (médias).

Le développement du marketing de la peur de l'aliment (**Michels, 2014**) a entraîné le consommateur à vouloir favoriser une alimentation saine sans danger pour sa santé. Ceci a contribué à la montée de la popularité des produits labélisés sous le nom de « biologique »,

connus pour être issus d'une agriculture respectueuse de l'environnement par des pratiques agricoles spécifiques (CE n°834/2007). Mais sont-ils pour autant meilleurs pour la santé ?

Il y a beaucoup de mythes autour de l'AB : totalement dépourvue de pesticides, meilleure pour la santé... du fait que ce mode de production privilégie les équilibres et les produits naturels. Mais ce qui est naturel n'est pas forcément meilleur pour la santé ou non toxique. Ce débat actuel sur le lien bio-santé est en grande partie corrélé avec la non utilisation de produits chimiques de synthèse (pesticides et engrais). L'étude la plus importante à ce sujet est une méta-analyse qui a été conduite par l'Université de Newcastle (incluant 343 publications) sur l'étude comparative de la composition des produits issus de l'AB et de l'agriculture conventionnelle. Cette étude fait ressortir qu'il y aurait de façon significative moins de composés indésirables tels que les résidus de pesticides, les métaux lourds toxiques (cadmium par exemple), l'azote et les nitrites et plus d'antioxydants (dont les polyphénols) dans les produits bio par rapport à leurs équivalents conventionnels (**Baranski et al., 2014**). Tandis que d'autres études contestent l'avantage des antioxydants, notamment celle de Cold Spring Harbor Laboratory publiée dans « The New England Journal of Medicine » qui démontre que, dans des situations spécifiques (fumeurs...), la consommation d'antioxydants augmenterait le risque de développer un cancer (**Chandel & Tuveson, 2014**).

Ces études citées ne sont que quelques exemples récents sur le sujet bio-santé, elles sont nombreuses et beaucoup se contredisent : à ce jour, les données scientifiques ne permettent pas de trancher sur le fait que les produits bio auraient ou non un effet bénéfique sur la santé contrairement aux études réalisées sur le lien santé et équilibre alimentaire. Il faudrait que des études comparatives soient menées sur le long terme et en conditions bien contrôlées pour vérifier si le bio est vraiment meilleur ou pas, ce qui n'est pas le cas aujourd'hui. Il faut noter aussi qu'il existe une multitude de pratiques, autrement dit, comme cela a été précisé précédemment, il n'existe pas un seul type d'AB ou conventionnelle puisque chaque producteur possède sa propre façon de cultiver (et donc adopte différentes stratégies de fertilisation des cultures, de lutte préventive contre les ravageurs et autres...). Par ailleurs, les variétés utilisées en AB ne sont généralement pas comparables à celles utilisées en agriculture conventionnelle. Cette grande diversité de pratiques mises en œuvre peut influencer de façon non négligeable la production des aliments (**Guéguen & Pascal 2010 ; Huber et al., 2011 ; Smith-Spangler et al., 2012**).

Les agriculteurs étant quotidiennement en contact avec les pesticides, la conduite de la production en AB serait donc meilleure pour leur santé et celle de leur entourage. En effet, de nombreuses publications scientifiques indiquent que l'exposition aux pesticides conduit à l'augmentation du risque de nombreuses pathologies (cancers, maladies neurodégénératives...) chez les enfants et dans l'entourage des agriculteurs utilisant des pesticides : l'expertise collective réalisée par l'INSERM, et publiée en 2013, recense des études réalisées sur 30 années sur les liens entre pesticides et plusieurs formes de cancer. En 2012, le Sénat avait également dénoncé dans un rapport les risques sanitaires des pesticides pour leurs utilisateurs. De plus, un rapport publié en 2015 par l'EFSA indique que les aliments consommés en Europe sont dans les normes et qu'il n'existe pas de risque à long terme pour la santé des consommateurs en relation avec les résidus de pesticides présents dans leur alimentation.

1.1.3.3. La complexité d'un système agricole qui peut encore progresser

Ainsi, l'hétérogénéité des paramètres à intégrer pour la comparaison des produits bio et conventionnels montre la complexité qui existe à pouvoir répondre à la question concernant l'impact de l'AB aussi bien sur l'environnement que sur la santé des consommateurs. Malgré cela, les recherches qui ont été menées à ce sujet permettent d'approcher une réponse, en particulier sur les services que l'AB peut offrir à l'environnement. Mais des progrès sont nécessaires pour arriver à une agriculture saine et durable, car de nombreuses aberrations peuvent être constatées en AB : i) utilisation du cuivre (bouillie bordelaise) et autres produits naturels (par exemple le soufre ou le pyrèthre) qui présentent des dangers avérés pour la santé et l'environnement mais dont l'utilisation est parfois la seule alternative efficace pour permettre la production ; ii) la plupart des insecticides utilisés en bio sont rapidement lessivés par la pluie alors qu'en conventionnel les insecticides utilisés sont systémiques, il faut donc en remettre très souvent dans le cas de l'AB, iii) retrouver des aliments bio hors saison sur les étalages des grandes distributions ; iv) utilisation d'emballages de produits bio en plastiques ou en aluminium, pas de réglementation ; v) une autre aberration qui peut être constatée est le fait que la filière de l'AB peine à répondre à la demande grandissante des consommateurs (français notamment), si bien que, pour que l'offre puisse satisfaire à la demande, une grande partie des produits bio doit être importée (ce qui augmente le risque de fraudes alimentaires). Et ceci va à l'encontre de l'intérêt écologique du bio.

Malgré ces aberrations, les consommateurs perçoivent les aliments issus de l'AB

comme étant plus sûrs que ceux issus de l'agriculture conventionnelle. Pour autant les recherches menées à ce sujet n'ont, pour le moment, pas permis d'étayer cette perception par des preuves scientifiques. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la comparaison des aliments en fonction de leur système de production est souvent compliquée à effectuer puisqu'il existe une grande variété de facteurs (environnementaux, pratiques agricoles etc...) qui peuvent avoir un impact sur l'aliment (**Reganold et al., 2010**).

La politique de la qualité et de l'origine, développée depuis de nombreuses années avec les signes d'origine (AOP par exemple) et labels agricoles (STG, le label AB etc...) se révèle être en conformité avec les aspirations actuelles des consommateurs. Mais la traçabilité des aliments est principalement garantie par des moyens administratifs (règlement UE n ° 178/2002), c'est pourquoi il est important de développer des outils d'analyse fiables pour garantir la traçabilité et l'authentification des aliments, notamment ceux issus de l'AB.

1.2. LA TRAÇABILITÉ ET L'AUTHENTICITÉ POUR ASSURER LA SÛRETÉ ALIMENTAIRE

1.2.1. Généralités

« Nous sommes ce que nous mangeons »

(Fischler, 1990).

« La crainte de "mourir empoisonné" succède à celle, plus ancestrale de "mourir de faim" »

(Cahuzac et al., 2007).

Ces expressions du sociologue Claude Fischler et du chercheur de l'INRA Éric Cahuzac traduisent bien l'ampleur du rapport existant entre l'Homme et les aliments qu'il consomme. L'attractivité pour les aliments issus de l'AB l'illustre d'ailleurs très bien.

Les crises alimentaires comme celles de la dioxine, la vache folle, la grippe aviaire, les graines germées ou encore la viande de cheval ont contribué à l'inquiétude des consommateurs et à leur peur vis-à-vis des denrées alimentaires. La manière dont les médias traitent de l'actualité alimentaire accentue cette psychose et la « crise » de la viande de cheval de 2013 en est un bon exemple récent. En effet, la surmédiatisation des crises alimentaires regroupe de plus en plus des cas de fraudes alimentaires qui sont sans risque sanitaire (comme le cas de la fraude à la viande de cheval) si bien que les crises alimentaires ont laissé place aux « crises de confiance alimentaire » (**Synthèse du rapport d'étude n°13083 du CGAAER¹⁶ « On mangeait mieux avant », octobre 2014**).

Face à ce constat, l'Union Européenne et l'industrie agroalimentaire ont dû mettre en place des solutions pour répondre à la demande des consommateurs et gagner leur confiance en leur garantissant des aliments sûrs, sans danger pour leur santé. La traçabilité et l'authenticité des aliments sont donc devenues aujourd'hui des défis importants aussi bien pour les organismes de contrôle et les industries alimentaires que pour la communauté scientifique. De nombreux travaux ont été menés récemment autour de ces deux notions avec le développement de nouveaux outils faisant principalement appels aux domaines de la physicochimie et de la biologie moléculaire (notamment à travers des projets européens tel

¹⁶ Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux.

que le projet Food Integrity¹⁷). Mais, si certaines filières comme celle des produits carnés (viande bovine) sont en avance, d'autres ont beaucoup plus de retard (par exemple les fruits et les légumes). De plus, la traçabilité et l'authentification alimentaires sont surtout assurées par des moyens administratifs et un besoin de plus en plus important d'outils analytiques appropriés se fait ressentir pour pouvoir assurer la sûreté alimentaire.

1.2.1.1. La sûreté alimentaire par la traçabilité

D'après l'Organisation Internationale de Normalisation, la traçabilité est un outil de gestion des risques permettant de retracer le cheminement de denrées alimentaires, depuis leur création à leur destruction (« de la fourche à la fourchette ») (ISO 22005:2007, « *Traçabilité de la chaîne alimentaire* »). La notion de traçabilité alimentaire a été également définie et révisée par le comité du *Codex Alimentarius* : « La traçabilité correspond à la capacité de suivre les déplacements d'un aliment au cours des stades précis de la production, de la transformation et de la distribution ». Les exigences réglementaires et la nécessité croissante d'assurer le suivi des produits alimentaires à travers la chaîne d'approvisionnement ont entraîné une forte attention de l'industrie sur la traçabilité. La nécessité pour l'identification rapide et précise des aliments, de leur origine, de leur emplacement au sein de la chaîne d'approvisionnement ainsi que la capacité d'exécuter un rappel efficace font partie de cette notion de traçabilité. Pour les organismes gouvernementaux, l'accent est principalement mis sur la sûreté alimentaire, mais les motivations de l'industrie sont beaucoup plus larges et comprennent la logistique de la chaîne d'approvisionnement, la qualité et la préservation de l'identité des aliments.

La traçabilité alimentaire est devenue obligatoire à travers le règlement CE N°178/2002 (article 18), également appelé « Food Law », qui constitue le règlement cadre européen sur la sûreté alimentaire et est à l'origine de la création de l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des aliments). À ce règlement est venu s'ajouter la norme internationale ISO 22000¹⁸ qui exige que l'entreprise établisse, en plus des PRP (programmes prérequis¹⁹) et de la méthode HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), un système de

¹⁷ Projet financé par l'Union Européenne pour la prévention des fraudes alimentaires (7ème PCRDT). Cette initiative, d'une durée de 5 ans (débuté en janvier 2014), a été lancée par l'agence britannique de recherche sur les aliments et l'environnement (FERA).

¹⁸ « Système de management de la sécurité des produits alimentaires », publiée en septembre 2005.

¹⁹ Ou bonnes pratiques générales d'hygiène, préalable indispensable à l'analyse des dangers et à la base du plan de maîtrise sanitaire.

traçabilité qui doit permettre d'identifier les fournisseurs de matières premières et les clients des produits finis.

On distingue en effet deux principaux types de traçabilité, ayant pour objectif commun d'assurer en priorité la sécurité des consommateurs en détectant rapidement les raisons d'un problème de non-conformité d'un produit (**Figure 1.5.**) :

- La traçabilité ascendante (ou « Tracing »), qui permet de retracer l'histoire du parcours d'un lot de produits finis, connaître son origine et la cause de sa défectuosité. Autrement dit, elle permet de remonter d'un produit fini vers les matières premières utilisées pour sa production.
- La traçabilité descendante (ou « Tracking »), qui permet de retrouver la destination d'un lot ou d'une unité de produit en suivant le parcours de leur fabrication à leur consommation et de les retirer du marché en cas de non-conformité selon le principe de l'assurance qualité.

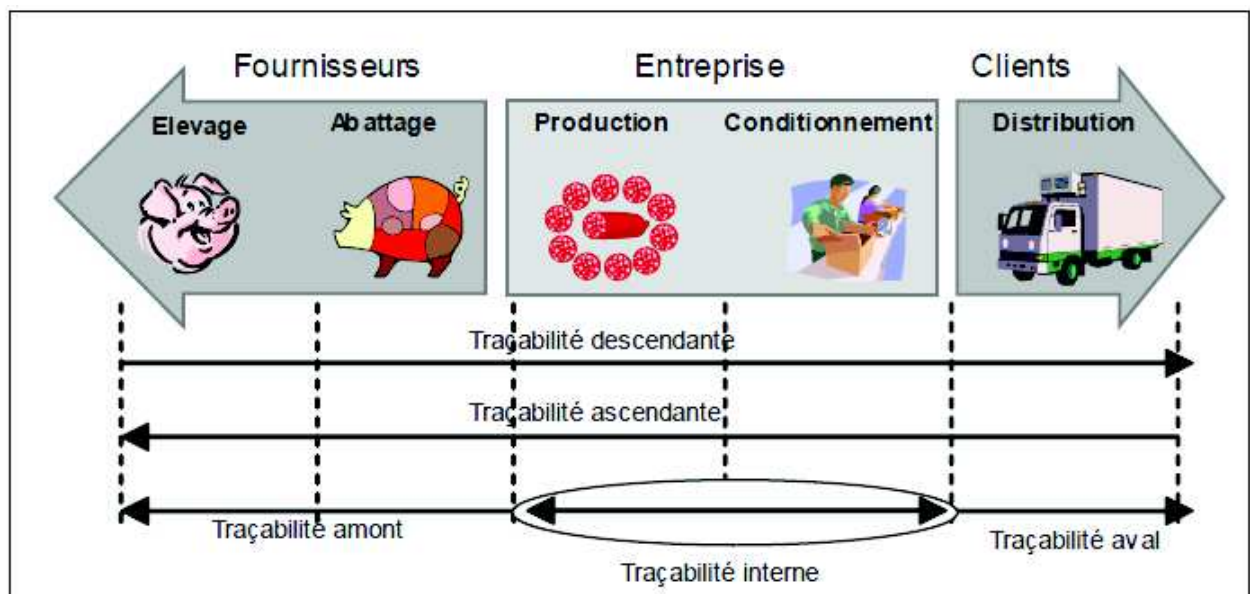


Figure 1.5. Les différentes étapes de la traçabilité dans l'agroalimentaire : exemple de la filière porcine (Dupuy, 2004).

En plus des traçabilités ascendantes (amont) et descendantes (aval), l'entreprise peut également assurer une traçabilité interne (non obligatoire, mais vivement conseillée) permettant le suivi de la réception de la matière première jusqu'au conditionnement du produit fini et d'établir un lien entre les produits entrants et les produits sortants. Cela permet ainsi d'optimiser la réactivité des industriels du secteur agroalimentaire et, en cas de crise, de limiter les quantités de nourriture retirées du marché (et donc d'avoir la possibilité de répondre rapidement et efficacement aux questions « qui, quand, quoi, où et comment »).

La traçabilité est devenue, en particulier depuis la crise de la vache folle (fin des années 1990 et début 2000), la préoccupation constante et obligatoire pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire : les producteurs, transformateurs et distributeurs doivent identifier et résoudre les points critiques (HACCP), effectuer des auto-contrôles mais aussi, informer les consommateurs sur la nature des produits (Règlement CE N°178/2002). Elle permet ainsi de gérer plus rapidement les crises et de retirer des lots de produit potentiellement dangereux pour la santé dans les plus brefs délais. La traçabilité est donc un élément fondamental de la politique de l'UE en matière de sûreté alimentaire. Elle devient le principal outil à la fois pour assurer la responsabilité effective des fabricants de produits alimentaires, les agriculteurs et les exploitants du secteur alimentaire en ce qui concerne la qualité du produit final et pour évaluer et gérer efficacement les risques (**Raspor, 2004**). Elle peut également être utilisée comme un atout commercial par les industriels pour se distinguer de leur(s) concurrent(s) notamment par le biais des labels. En effet, divers labels alimentaires sont conçus pour aider à préserver et à garantir la qualité des produits alimentaires en provenance de zones géographiques particulières (AOP/AOC en France, équivalent au PDO en Europe) et d'un mode de production spécifique (AB par exemple) afin de protéger les consommateurs contre les imitations et/ou fausses informations sur le produit et les concurrences déloyales. Tous ces labels doivent obligatoirement respecter un cahier des charges rigoureux qui précise les référentiels (normes) permettant la certification et qui doit être agréé en France par l'INAO (Institut national de l'origine et de la qualité), ou par un organisme certificateur accrédité par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC), reconnu par les pouvoirs publics, et en Europe par la Commission Européenne (selon les règlements européens CE 510/2006 pour les appellations d'origine ; CE 509/2006 relatif aux Spécialités Traditionnelles Garanties et CE 834/2004 et 889/2008 relatif aux produits issus de l'AB). En France, la bonne utilisation de ces labels alimentaire est garantie par des organismes de contrôle (ECOCERT, QUALISUD, DEKRA, AFNOR...) qui sont eux même accrédités par le COFRAC et agréés par l'INAO (**agriculture.gouv.fr**). La DGCCRF peut également intervenir pour vérifier la conformité des labels. Pour que l'accréditation ait une reconnaissance internationale et mondiale, les différents organismes d'accréditation nationaux doivent appliquer des accords (MLA/MRA) mis en place par l'European cooperation for Accreditation (EA), l'International Laboratory Accreditation Co-operation (ILAC) et l'International Accreditation Forum (IAF).

La récente crise alimentaire de la viande de cheval a remis sur le devant de la scène les questions sur la traçabilité. Elle a en effet montré que des fraudes étaient toujours possibles à

grande échelle malgré les efforts de traçabilité et de contrôles alimentaires. Ces systèmes de traçabilité étant généralement basés sur une "trace écrite" continue et un étiquetage efficace, la nécessité d'appliquer des outils analytiques robustes et efficaces en complément de la traçabilité « documentaire » s'est fait ressentir ces dernières années non seulement pour aider à lutter contre les pratiques frauduleuses, mais aussi pour vérifier la provenance des aliments et prouver leur authenticité. Le lien entre la traçabilité et l'authenticité des aliments est très étroit : ces deux notions ne peuvent être employées l'une sans l'autre puisque l'authenticité fait partie intégrante de la traçabilité. La différence étant que la traçabilité d'un produit correspond à son « parcours historique », de sa production jusqu'à sa consommation (**Figure 1.5.**), alors que l'authentification de ce produit consiste à garantir qu'il s'agit bien d'une pomme bio et non d'une pomme conventionnelle par exemple.

1.2.1.2. Garantir l'authenticité des aliments pour lutter contre la fraude alimentaire

Déterminer l'authenticité des aliments signifie être capable de détecter si la description des aliments est correcte ou erronée et ne répond pas aux exigences d'un nom légal, si des ingrédients ont été remplacés par d'autres moins chers, mais similaires, si des processus ne sont pas déclarés (par exemple irradiation, congélation...) et si l'origine (géographique, espèce...) est incorrecte.

L'industrialisation et la mondialisation ont rendu très difficile l'authentification des aliments du fait qu'une grande partie des produits qui nous sont proposés sont transformés (d'après l'Insee, près de 80% des aliments que nous consommons sont transformés) et sont donc aussi plus vulnérables aux falsifications. La fraude alimentaire (en passant par l'étiquetage falsifié à la substitution d'ingrédients par des substituts moins onéreux) et l'authentification des aliments sont donc devenues des sujets émergents dans le secteur alimentaire. D'autant plus que les fraudes sont de plus en plus sophistiquées pour contourner au mieux les contrôles et donc de plus en plus difficiles à détecter par des analyses classiques. Il est donc nécessaire de recourir à des techniques analytiques avancées pour détecter les produits non-conformes. Les aliments bio font d'ailleurs partie des aliments ayant un risque élevé de fraude (d'après les travaux et les informations recoupées par la Commission de l'environnement, de la santé publique et de la sécurité alimentaire du Parlement européen, 2013/2091(INI)) :

Tableau 1.1. Les produits alimentaires présentant le plus de risques de fraude (Commission européenne, 2013).

| Top 10 des produits qui risquent le plus de faire l'objet de fraude alimentaire | |
|---|--|
| 1 | Huile d'olive |
| 2 | Poisson |
| 3 | Aliments biologiques |
| 4 | Lait |
| 5 | Céréales |
| 6 | Miel et sirop d'érable |
| 7 | Café et thé |
| 8 | Épices (comme le safran et la poudre de chili) |
| 9 | Vin |
| 10 | Certains jus de fruit |

Ces préoccupations sont devenues majeures non seulement pour les consommateurs, mais aussi pour les producteurs, les distributeurs et les autorités. Ces activités illicites entraînent non seulement des pertes économiques considérables à travers le monde mais érodent aussi la confiance des consommateurs qui remettent en question la crédibilité des labels alimentaires. Assurer l'authenticité des aliments nécessite des outils puissants et fiables pour l'analyse, la traçabilité et le contrôle. L'authenticité va de pair avec la quête de nostalgie des produits naturels par les consommateurs. La demande des consommateurs pour des aliments locaux ou cultivés selon les pratiques de l'AB est de plus en plus forte. Cette forte demande liée au développement rapide des systèmes de production bio a posé des difficultés quant à la certification et la garantie des produits issus de l'AB venant du monde entier (sachant aussi que les produits bio font partie des produits les plus difficiles à contrôler car cela est dépendant du type de produit). Bien que la "valeur ajoutée" de ces produits soit garantie par un système de certification qui devrait justifier leur traçabilité à tous les stades de la production, de la transformation et de la commercialisation (CE 834/2007 notamment), les systèmes actuels sont principalement administratifs et peuvent être falsifiés (les risques varient selon les pays : très peu de fraudes en France comparée à l'Espagne ou la Roumanie par exemple). Les fraudes étant motivées par le prix des produits bio qui sont plus chers que les produits conventionnels. Le problème concerne principalement les petites boutiques, les marchés de producteurs et les ventes par Internet plutôt que les grands détaillants et les supermarchés. En 2014, la DGCCRF a relevé 25% de non-conformités sur 1 070 établissements français contrôlés. Ces non-conformités étaient principalement liées au non-respect de la réglementation relative à l'AB : présence de résidus de pesticides non

autorisés en AB et d'OGM à un taux supérieur à 0,9%, mais également non-respect de la réglementation générale en matière de métaux lourds (www.economie.gouv.fr/dgccrf/plan-control-annuel-filiere-lagriculture-biologique).

Ainsi, pour assurer l'authenticité des aliments commercialisés et étiquetés comme « biologiques », il y a un besoin existant de méthodes de contrôle et d'analyse robustes, précises et peu coûteuses pour appuyer les systèmes de certification, de contrôle ou de traçabilité.

1.2.2. Les outils analytiques pour assurer la traçabilité et garantir l'authenticité des aliments

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 2,2 millions de personnes à travers le monde souffrent de maladies diarrhéiques chaque année, dont la plupart sont transmises par la nourriture et l'eau (Pinu, 2015). Le changement climatique et la pollution de l'environnement ont également un effet néfaste sur la qualité des aliments par l'introduction de nombreux contaminants (Brambilla & Testa, 2014 ; Guan & Sun, 2014 ; Seltenrich, 2015). En particulier, les concentrations en pesticides et autres composés xénobiotiques sont en augmentation dans de nombreux produits alimentaires et une attention particulière doit y être apportée (Pinu, 2015). De plus, avec la mondialisation et l'industrialisation de l'alimentation, la fraude et les cas de contamination des aliments peuvent avoir un impact international et entraîner des conséquences de grande envergure (Cubero-Leon *et al.*, 2014). Dans ce contexte, les politiques alimentaires européennes et mondiales exigent un suivi et un contrôle strict des produits alimentaires. Il y a un besoin croissant de nouveaux outils pour nous aider à réaliser cette surveillance.

1.2.2.1. Généralités

De nouvelles technologies ont fait leur apparition au cours de ces dernières années. En effet, il existe de nombreuses techniques disponibles et émergentes qui permettent d'assurer la traçabilité et l'authenticité des aliments (Palmieri *et al.*, 2009 ; Herrero *et al.*, 2010 ; Picariello *et al.*, 2012 ; De Oliveira *et al.*, 2013 ; Dufossé *et al.*, 2013 ; Galinberti *et al.*, 2015). Utilisés en combinaison, ces outils peuvent être extrêmement puissants pour compléter ou remplacer une partie des protocoles analytiques existants, coûteux et fastidieux. Ces méthodes peuvent être classées en deux grandes catégories (Peres *et al.*, 2007 ; Leeuwen *et al.*, 2014) : 1) les techniques physicochimiques où la recherche des « traceurs » consiste à

extraire et étudier les composés volatils d'un produit (laits, viandes, fromages, vins...). Ces techniques utilisent, par exemple, la variation en isotopes stables de l'aliment (par résonance magnétique nucléaire ou RMN) ou encore son empreinte spectrale (par NIRS, par exemple). Les isotopes stables sont d'ailleurs de plus en plus utilisés dans les domaines de l'authenticité et de la traçabilité alimentaire (**Zhao et al., 2014**). Ils ont en effet été adoptés par la Communauté Européenne et des organismes internationaux non seulement pour la détection de fraudes et la garantie d'authenticité, mais aussi pour la détermination de l'origine géographique, en particulier en ce qui concerne le vin (règlement CE N°2348/91). D'ailleurs, depuis 1991, il existe une banque de données isotopiques Européenne que chacun des pays membre de l'UE se doit de maintenir (règlements CE N°479/2008 et CE N°606/2009) en fournissant des données annuelles des analyses isotopiques de chaque zone viticole. Mais ces analyses isotopiques sont souvent limitées par la difficulté d'obtenir des données complètes et non biaisées. De plus, de façon généralisée aux méthodes physicochimiques, le coût de l'équipement, l'investissement important qui est requis pour la constitution d'une banque de données et la préparation des échantillons ont amené les chercheurs à s'intéresser de plus en plus aux ii) techniques biologiques qui utilisent l'analyse de l'ADN, l'ARN ou les protéines présentes dans l'aliment et/ou de la flore microbienne associée (méthodes biochimiques ou de biologie moléculaire). La majorité des techniques appliquées à des fins de traçabilité et d'authenticité font appel aux « sciences omiques » (génomique, transcriptomique, métabolomique...), appelées « Foodomiques » dans le domaine de l'agroalimentaire (**EFSA, 2013**). Depuis l'achèvement du projet du génome humain, les sciences de différents secteurs (dont alimentaires et nutritionnelles) ont en effet connu une évolution moléculaire fondamentale. De nouvelles découvertes en biologie moléculaire, chimie analytique ou biochimie ont conduit à l'élaboration de nouvelles technologies qui sont susceptibles de révolutionner l'étude de l'aliment, en particulier les technologies de séquençage à haut débit (ou NGS pour Next Generation Sequencing). Suite aux progrès récents de la biologie moléculaire, l'analyse ADN est devenue un outil très efficace pour répondre aux besoins de différents domaines (médical, alimentaire...). Elle fournit plus d'information que ne pourraient apporter les méthodes basées sur l'analyse de protéines ou chimique (**Madesis et al., 2014**). En effet, l'ADN est une molécule relativement thermostable qui offre donc une grande puissance de conservation comparé à d'autres molécules. De plus, l'ADN résisterait mieux aux procédés industriels physiques et chimiques (**Galinberti et al., 2015**). Si bien que cette molécule, et en particulier les méthodes basées sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction), sont rapidement devenues la base pour le développement d'outils largement

employés dans le domaine du contrôle des aliments. Les résultats des différentes études appliquant des outils basés sur l'analyse de l'ADN montrent bien l'intérêt de développer des méthodologies faisant appel à la biologie moléculaire pour leur applicabilité dans le domaine de l'agroalimentaire (**Palmieri et al., 2009 ; Galinberti et al., 2013**). Ces méthodes peuvent être utilisées pour définir la variété végétale ou animale d'un produit alimentaire (**Palmieri et al., 2009**) mais elles permettent également d'étudier les microorganismes qui sont présents dans ce produit. Les méthodes globales sont de plus en plus exploitées dans le domaine de l'agroalimentaire, en particulier les outils d'empreinte moléculaire, notamment pour l'étude des populations microbiennes complexes. En effet, ils permettent de déterminer la composition d'une communauté et de comparer différentes communautés entre elles en se basant sur la comparaison de séquences d'ADN (ou d'ARN) des microorganismes qui les composent. Ceci permet par exemple d'évaluer et de caractériser les communautés microbiennes associées à un aliment donné (**Ercolini, 2004**). Grâce au typage moléculaire, il est possible de s'affranchir des techniques de cultures traditionnelles. Un autre avantage est de pouvoir étudier les microorganismes viables non-cultivables ainsi que des non viables, ou encore les anaérobies. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible (**Peres et al., 2007**).

1.2.2.2. Application aux aliments issus de l'agriculture biologique

Différentes stratégies ont été développées pour l'authentification des produits bio par rapport aux conventionnels. Ces stratégies sont très variées et font appel à différents domaines, allant des analyses chimiques, isotopiques ou enzymatiques (**Camin et al., 2011 ; Laursen et al., 2014 ; Mihailova et al., 2014**) aux méthodes basées sur l'analyse d'ADN (**Woolfe et al., 2004 ; Palmieri et al., 2009**). Les analyses isotopiques et la spectroscopie infrarouge sont les approches les plus courantes. L'application de l'empreinte isotopique par RMN et par spectrométrie de masse de rapports isotopiques a permis de réaliser le traçage de l'origine d'un aliment mais aussi l'analyse de la signature des isotopes stables comme marqueurs de traçabilité des aliments bio (**Pérez-Marín et al., 2011 ; Van Ruth et al., 2011 ; Tres et al., 2012 ; Flores et al., 2013 ; Sánchez et al., 2013**).

Très peu d'études ont investigué la flore microbienne des aliments bio (**Ottesen et al., 2009 ; Leff et al., 2013 ; Bigot et al., 2015**). D'autant plus lorsque l'on recherche des travaux qui se pencheraient plus particulièrement sur l'utilité des microorganismes naturellement

présents sur les aliments comme « outil » potentiel pour leur discrimination en fonction de leur mode de production. En effet, les microorganismes recherchés dans les aliments bio (comme dans les conventionnels) sont plutôt les pathogènes de l'homme (**Hoogenboom et al., 2008 ; Ottesen et al., 2009 ; Maffei et al., 2013**) ou bien les microorganismes qui se trouvent dans les sols bio et conventionnels (**Shannon et al., 2002 ; Wallis et al., 2010 ; Reilly et al., 2013**). Or, les intrants appliqués au champ étant différents selon le type d'agriculture, on peut supposer que les pratiques agricoles auront un impact significatif sur la flore microbienne globale retrouvée sur l'aliment. Il existerait donc une « signature » spécifique à un mode de production donné, signature qui pourrait être utilisée à des fins d'authenticité et/ou de traçabilité. D'où l'intérêt de notre étude sur le sujet pour la recherche d'une méthode innovante permettant de discriminer les aliments en fonction de leur mode de production par analyse comparative de leur écosystème microbien. De précédentes études menées au sein de l'équipe ont déjà pu démontrer qu'il était possible de relier l'empreinte microbienne d'un aliment à son origine géographique (**Le Nguyen, 2008 ; El Sheikha et al., 2009 ; Tatsadieu et al., 2010 ; Duffossé et al., 2013**). En se basant sur cette stratégie dans le cadre de ma thèse, nous avons souhaité mesurer l'influence des traitements sur la flore microbienne des aliments.

1.2.2.3. Les marqueurs d'authenticité

Le développement récent d'outils analytiques modernes a entraîné la mise au point de méthodes permettant la mesure et la détection objective du caractère authentique d'un produit alimentaire issu de l'AB. L'ensemble des recherches qui ont été menées en appliquant ces outils a permis de faire ressortir des biomarqueurs d'authentification. La revue de **Capuano et al. (2012)** offre un vaste aperçu des approches qui ont été investiguées et des biomarqueurs qui ont été proposés par la communauté scientifique comme étant potentiels pour la discrimination des aliments bio. Du fait que de nombreuses études ont montré que la teneur en résidus de pesticide était systématiquement plus faible dans les aliments bio que dans les aliments conventionnels et que les concentrations mesurées étaient le plus souvent en dessous des limites de détection analytique, les méthodes basées sur la mesure du contenu en isotopes stables (H^2 , C^{13} , O^{18} , N^{15} , etc...) présents dans les produits alimentaires bio, d'origine végétale ou animale, sont le plus souvent appliquées (**Hoefkens et al., 2009 ; Laursen et al., 2014**). Les outils analytiques permettant ces mesures sont principalement la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et/ou la spectrométrie de masse pour la mesure du rapport isotopique (IRMS ou Isotope Ratio Mass Spectrometry).

Pour la discrimination des aliments bio des conventionnels, on retrouve en particulier l'étude de l'abondance isotopique en C^{13} et N^{15} , utilisés comme marqueurs du mode de production (**Bateman et al., 2007 ; Camin et al., 2011 ; Klaus et al., 2013 ; Chung et al., 2014**). **Laursen et al. (2014)** ont cependant démontré que l'analyse multi-isotopique a le potentiel de détecter des fraudes dans les produits bio de façon plus efficace que l'analyse ciblée de certains isotopes stables. Cela est également souligné par **Capuano et al. (2012)** qui précisent que, même si les isotopes stables se sont révélés être de précieux indicateurs d'authenticité pour les produits alimentaires bio (d'origine animale et végétale), une discrimination efficace ne peut se faire seulement sur la base unique de l'analyse de ces isotopes stables. En effet, les stratégies d'analyse basées sur la mesure de plusieurs marqueurs seraient plus prometteuses pour l'authentification des aliments bio. De plus, on voit apparaître de plus en plus d'approches faisant appel à la « Foodomique », en particulier la métabolomique et la protéomique, pour la discrimination des aliments bio (**Nawrocki et al., 2011 ; Novotná et al., 2012 ; Mie et al., 2014**). Dans ces études, il a été également souligné que la combinaison de biomarqueurs de métabolomique/protéomique avec ceux dérivés de données d'autres outils d'analyse, tels que les isotopes stables (**Laursen et al., 2014**) pourrait améliorer la fiabilité de l'authentification des aliments bio.

Malheureusement, les protéines et les métabolites sont des molécules peu stables et ceci peut entraîner des incohérences au niveau des résultats (**Scarano & Rao, 2014**). En effet, comme cela a été précisé précédemment, l'ADN est plus stable et résisterait le mieux aux procédés industriels physiques et chimiques (**Galinberti et al., 2015**) le long de la chaîne alimentaire. Ainsi, en raison de leur universalité, les codes-barres d'ADN microbiens peuvent être utilisés dans différents contextes (suivi de procédés, traçabilité, authenticité...) et par différents opérateurs. Ils sont donc susceptibles d'être utilisés pour des tests de routine dans de nombreux domaines, et en particulier pour le contrôle de la qualité et de la traçabilité des aliments. Leur applicabilité sur différentes matrices alimentaires (poissons, viandes, fromages, fruits...) démontre la robustesse de ces techniques et justifie leur emploi dans le cadre de ma thèse. À ce jour, il n'existe aucun marqueur microbien permettant d'authentifier les produits bio. Même si des résultats de recherche ont permis de montrer l'influence des modes de production sur la flore microbienne des aliments (**Leff et al., 2013**), les seuls marqueurs microbiens étudiés sont ceux permettant de faire le lien à l'origine géographique d'un aliment à des fins de traçabilité (**Le Nguyen et al., 2008 ; El Sheikha et al., 2009 ; Tatsadieu et al., 2010 ; Duffossé et al., 2013**).

1.3. COMMENT DÉCRIRE ET ÉTUDIER UN ÉCOSYTÈME MICROBIEN

1.3.1. La flore microbienne des fruits

Les produits frais constituent une part importante dans notre régime alimentaire. La consommation régulière de fruits et légumes est fortement recommandée du fait de leur bienfait pour la santé : riches en fibres, vitamines, minéraux et antioxydants, ils réduiraient le risque de certaines maladies, à savoir les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou le cancer entre autres (**Ignarro et al., 2007** ; **Liu, 2003**). Outre cet aspect, les fruits et légumes sont également reconnus pour arborer une flore microbienne large (**Leff et al., 2013**). Mais l'exploration de cette diversité microbienne n'en est qu'à ses prémices. En effet, une majorité d'études portent sur les germes pathogènes d'origine humaine (par exemple *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Campilobacter*) susceptibles d'entraîner des maladies alimentaires graves, d'autant plus que les fruits et les légumes sont majoritairement mangés crus (**Beuchat, 2006**). La contamination microbienne peut avoir lieu à n'importe quelle étape du processus alimentaire, que ce soit durant les stades de la culture, de la récolte, du traitement, de l'entreposage ou de la préparation. Plusieurs épidémies d'origine alimentaire ont d'ailleurs été largement médiatisées, notamment celle associée aux graines germées (de plus en plus prisées par les adeptes du bio), où des cas d'infections par la bactérie *Escherichia coli* enterohémorragique de sérotype O104:H4 ont été relevés en France et en Allemagne avec plus de 50 décès en 2011. Les maladies d'origine alimentaire (ou intoxications alimentaires) sont d'ailleurs le plus souvent causées par des contaminations liées à l'exposition aux déchets humains ou animaux, à une mauvaise hygiène ou encore à une eau d'irrigation contaminée (**efsa.europa.eu**).

Les microbes peuvent également être associés à des maladies d'altération des denrées alimentaires. Les fruits et les légumes sont, en raison de leur forte teneur en eau, des denrées extrêmement périssables et donc les plus sujets à la détérioration, notamment dans les pays tropicaux. La détérioration des aliments peut avoir diverses origines (attaques d'insectes ou de rongeurs ; climat...), mais la principale cause est celle liée à la prolifération de certains des microorganismes qui les contaminent (**Beuchat, 2006**).

De façon plus générale, les travaux qui ont été réalisés jusqu'à ce jour sur les communautés microbiennes associées aux produits frais dégagent les principales observations suivantes : 1) la composition et l'abondance des communautés microbiennes sont influencées par une de multiples facteurs, comme le mode de production, le stockage et les traitements

post-récoltes ; ii) il existe une compétition entre les microorganismes, les pathogènes peuvent être inhibés par d'autres microorganismes non-pathogènes qui se développent naturellement sur la surface de l'aliment ; iii) les fruits et les légumes possèdent de nombreux mécanismes de défense naturelle, en passant par la peau qui constitue une barrière contre les pathogènes, mais aussi par la production de substances antimicrobiennes (anthocyanines, huiles essentielles, acides organiques...). À noter également que les études sur les communautés microbiennes des fruits sont portées principalement sur des produits post-récolte alors qu'il y aurait un intérêt à étudier les microorganismes liés aux maladies d'altération avant la récolte des fruits (ou des légumes). Ceci permettrait de prévenir leur apparition et de réduire les pertes alimentaires qui, selon les données de la FAO, s'élèveraient à environ 1,3 milliards de tonnes par an dans le monde, soit environ un tiers de la nourriture produite pour la consommation humaine. La colonisation fongique avant la cueillette est généralement la cause principale de la pourriture après récolte. L'apparition de cette pourriture est associée à la production d'enzymes microbiennes dégradant les parois cellulaires. La sensibilité des fruits aux maladies d'altération va de pair avec leur stade de maturité : plus un fruit est mûr moins il produira de substances antimicrobiennes et plus ses parois cellulaires seront susceptibles d'être dégradées par des enzymes microbiennes.

Malgré cela, les connaissances sur les communautés microbiennes liées aux produits frais restent très limitées, que ce soit sur les facteurs influençant leur développement ou l'identification de ces groupes microbiens (en particulier les viables non cultivables). Cela est d'autant plus vrai lorsque l'on se penche sur le cas des produits issus de l'AB. L'utilisation d'engrais et d'amendements d'origine naturelle, le recyclage et le compostage des matières organiques, l'absence de produits chimiques de synthèse (pesticides...), d'OGM et d'antibiotiques, pourrait laisser penser que les aliments issus de l'AB seraient plus exposés aux contaminations microbiennes comparé à leurs homologues conventionnels, et donc, qu'ils seraient susceptibles d'entraîner des intoxications alimentaires. Les articles scientifiques se contredisent à ce sujet, de même que sur les propriétés nutritionnelles des aliments issus de l'AB. Si bien qu'il devient difficile de reconnaître le vrai du faux, surtout pour le consommateur. Il sera certainement très difficile d'éclaircir ce sujet puisqu'il faudrait réaliser des études comparatives à long terme sur des populations qui consomment des aliments bio et conventionnels.

Néanmoins de récentes études ont été menées sur la composition de la flore microbienne des aliments bio ce qui a permis d'éclaircir différents questionnements : comment décrire l'environnement microbien des aliments, en particulier les fruits ? Quel est l'impact des traitements sur la diversité microbienne des fruits ? Ces études traitent en particulier de la phyllosphère des plantes. Cette phyllosphère comprend les parties aériennes des plantes utilisées comme habitat pour les microorganismes totaux hors sol (par exemple sur les feuilles, fleurs, fruits). Les études sur le microbiome de la phyllosphère des fruits ont révélé que cette phyllosphère abritait une grande variété de micro-organismes épiphytes (**Whipps et al., 2008 ; Lindow & Brandl, 2003 ; Lindow & Leveau, 2002**) et que les bactéries seraient prédominantes et plus diversifiées en terme d'espèces par rapport aux levures et aux champignons filamenteux (**Lindow et Brandl, 2003 ; Whipps et al., 2008**). Cette phyllosphère est actuellement de plus en plus exploitée par des méthodes de séquençage à haut débit : les travaux menés par **Leff et al. (2013)** sur un ensemble de fruits et légumes ont permis de démontrer que ces derniers abritaient des communautés bactériennes diverses et nettement distinctes d'un type de produit à un autre. Ils ont également observé que certains types d'aliments (les choux, les épinards, la laitue, les tomates, les poivrons, et fraises) avaient tendance à partager des communautés similaires avec une majorité de taxons appartenant à la famille des *Entérobactéries* par rapport aux autres types de produits (pommes, pêches, raisins, champignons) dont les taxons avaient tendance à se regrouper dans les phyla des *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*. De plus, des différences significatives ont été observées dans la composition des communautés microbiennes selon si le produit était issu de l'AB ou conventionnelle : les espèces appartenant aux *Entérobactéries* étaient généralement moins abondante dans les produits bio. Cette étude est en adéquation avec les résultats de l'étude d'**Ottensen et al. (2008)**. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'homme est exposé à des bactéries sensiblement différentes selon les types de produits frais qu'il consomme et selon leur mode de production.

L'écosystème microbien des fruits offre donc un large champ d'études qu'il serait intéressant d'exploiter afin de mieux comprendre la persistance de certains groupes microbiens. Les recherches sont encore naissantes en ce qui concerne la description d'une microflore de référence pour toute culture, et en particulier pour les aliments cultivés selon différents modes de production, ce qui a fait l'objet de cette thèse.

Pour notre étude, nous avons été amenés à nous limiter aux fruits de consommation courante et échantillonnés au moment de la récolte : les pommes, les bananes, les pêches et les nectarines. Principalement pour des raisons liées à l'accessibilité des échantillons mais aussi, dans le cas des pommes et des bananes, parce que ces fruits font partie du palmarès des fruits les plus périssables et donc les plus traités. De plus, dans le cadre de ma thèse, parce que nous savons que les techniques de microbiologie classique ne permettent d'identifier qu'une infime partie de la diversité microbienne (Yashiro *et al.*, 2011), ces questions ont été abordées en appliquant des méthodes de biologie moléculaire pour l'analyse de la flore microbienne globale présente à la surface des fruits.

1.3.2. L'analyse moléculaire pour l'étude de communautés microbiennes

1.3.2.1. De l'approche traditionnelle à la métagénomique

Au cours des dernières années, les méthodes moléculaires ont été appliquées à des échantillons alimentaires en complément ou en remplacement des méthodes dites classiques (ou de culture-dépendante). Ces premières approches de "métagénomique" ont grandement facilité la description et la caractérisation des espèces microbiennes associées aux aliments. La métagénomique peut être décrite comme étant une application des techniques modernes de génomique (d'où l'utilisation du préfixe « méta » qui fait référence à « ce qui vient après ») pour permettre l'étude de communautés microbiennes dans leur environnement naturel, sans nécessité de passer par des étapes d'isolement et de culture (Chen & Patcher, 2005). Par comparaison avec les méthodes basées sur la microbiologie classique, les approches de métagénomique sont destinées à donner une description plus rapide et plus complète de la diversité microbienne des aliments. En effet, la biodiversité microbienne est très souvent sous-estimée lorsque son étude passe par les méthodes culture-dépendantes : 95 à 99 % des micro-organismes observés dans la nature ne seraient pas cultivables (Amann *et al.*, 1995 ; Kirk *et al.*, 2004). On estime d'ailleurs que seulement 1% des micro-organismes existants ont été jusqu'ici identifiés.

La métagénomique est basée sur l'analyse des acides nucléiques (ADN/ARN) et est fréquemment associée à des outils de séquençage de masse et de bioinformatique. Ces méthodes ont également été appliquées sur des produits alimentaires très variés (Justé *et al.*, 2008). Mais connaître la diversité microbienne d'un écosystème donné (un fruit par exemple) est une chose, l'identification de ses fonctionnalités en est une autre. Pour cela, il est nécessaire de faire appel à des méthodes de métagénomique fonctionnelle. Ces méthodes

permettent d'explorer de façon plus ciblée la diversité des activités microbiennes ayant des fonctions spécifiques dans un écosystème donné au niveau du gène (ADN) et de son expression (ARN). Cette approche permet, à partir d'un environnement donné, la découverte de nouvelles molécules ou d'enzymes et une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction. Cette approche repose sur le développement de techniques de criblage de banques de clones. En aval de la métagénomique on retrouve souvent la métatranscriptomique qui consiste à séquencer en masse l'information génétique exprimée, ou l'ARN (au travers de l'ADNc issu de la rétrotranscription des ARNm), d'un environnement donné pour l'étude du rôle de certains facteurs sur l'expression de fonctions biologiques ayant un rôle clé (**Bokulich *et al.*, 2012**). Bien que la métagénomique apparaisse comme étant fréquemment associée aux techniques de séquençage massif, d'autres méthodes moléculaires peuvent également être employées afin d'étudier la diversité microbienne des aliments et font souvent appel à des approches dites de « fingerprinting » ou d'empreinte moléculaire.

1.3.2.2. Les techniques d'empreinte moléculaire

Également appelées méthode de typage moléculaire ou de génotypage, les techniques d'empreinte moléculaire permettent de mesurer des variations au niveau des séquences d'acides nucléiques. Des régions cibles d'ADN (ou d'ARN) sont souvent analysées par ces méthodes couplant les amplifications par PCR à des techniques électrophorétiques (DGGE - Denaturing Gel Gradient Electrophoresis ; TGGE - Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; ARISA – Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis ; SSCP - Single-Strand Conformation Polymorphism ...), de clonage ou faisant appel à des enzymes de restriction (T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism ; ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ; PFGE - Pulse Field Gel Electrophoresis ...) (**Nocker *et al.*, 2007**).

Lorsque l'on souhaite étudier l'empreinte globale des communautés microbiennes d'un aliment, l'amplification par PCR est le plus souvent réalisée avec des amorces ADN universelles ciblant différentes régions de l'ADN ribosomique (ADNr) selon le type de microorganisme que l'on souhaite analyser (16S pour les bactéries, 26S pour les levures et 28S pour les moisissures, par exemple). Ces méthodes globales fournissent un aperçu des principaux taxons qui caractérisent ces communautés mais le niveau de résolution est souvent insuffisant pour pouvoir réaliser l'identification au niveau de l'espèce. Dans certains cas, l'information « globale » n'est pas suffisante pour répondre à la question de recherche.

Cependant, pour pouvoir étudier les acteurs d'un écosystème microbien de manière globale et intégrée, les recherches font souvent appel à ces techniques utilisant des marqueurs moléculaires microbiens.

1.3.2.3. Les marqueurs moléculaires d'ADN microbiens

Ces marqueurs font partie des plus étudiés et des plus appliqués pour la compréhension de communautés microbiennes complexes dans des environnements particuliers. Au cours des deux dernières décennies, différents marqueurs moléculaires microbiens ont été employés pour des études le plus souvent basées sur la taxonomie phylogénétique, en particulier, pour la classification des espèces bactériennes. Depuis l'avènement de l'amplification par PCR (**Mullis *et al.*, 1986**) et les travaux de **Woese (1987)**, la taxonomie et l'écologie microbienne ont connu de grandes avancées. Différents marqueurs moléculaires pour la caractérisation de la diversité bactérienne ont été mis au point et ont permis le typage de souches microbiennes et l'établissement de relations phylogénétiques entre les microorganismes. Ces marqueurs correspondent le plus souvent à des séquences d'ADNr. Ce sont des marqueurs évolutifs robustes qui permettent de décrire la phylogénie et l'évolution des populations microbiennes au cours du temps. En effet, les ARN ribosomiques (ARNr) possèdent une horloge moléculaire lente, autrement dit ces molécules vont évoluer plus lentement que le reste du génome (**Woese 1987**). Du fait de leur caractère essentiel au fonctionnement des cellules, les ARNr sont présents dans toutes les cellules vivantes : on retrouve dans les cellules eucaryotes des ARNr 28S, 26S 18S, 5,8S et 5S et dans les cellules procaryotes des ARNr 23S, 16S et 5S (**Figure 1.6.**). Chez les bactéries, les gènes codants pour ces ARNr sont organisés en opérons et peuvent être présents en une ou plusieurs copies dans les génomes (1 à 15 copies par génome bactérien) (**Rainey *et al.*, 1996**). Un opéron est un groupe de gènes co-transcrits, c'est-à-dire qu'ils font partie d'une unité de transcription unique. Les ARNr bactériens 5S, 16S et 23S sont produits à partir d'un seul opéron chez les bactéries. Concernant les espèces fongiques, l'ADNr nucléaire est constitué d'une unité répétée (d'après **Cassidy *et al.*, 1984**, entre 50 et 100 fois selon les espèces). Cette unité contient des gènes extrêmement conservés codant pour des ARNr et des « espaceurs » intergéniques transcrits et non transcrits (**Figure 6**). L'espaceur intergénique transcrit (ITS, Internal Transcribed Spacer) s'étend entre les régions des gènes de l'ARNr 18S et 28S. Il contient le gène 5.8S encadré par l'ITS1 et l'ITS2. Pour ce qui est de l'espaceur intergénique non transcrit (IGS, interGenic Spacer), il représente la portion comprise entre le gène de l'ARNr 28S et 18S de l'unité suivante (non représenté ici) et contient le gène de l'ARNr 5S encadré par l'IGS1 et l'IGS2.

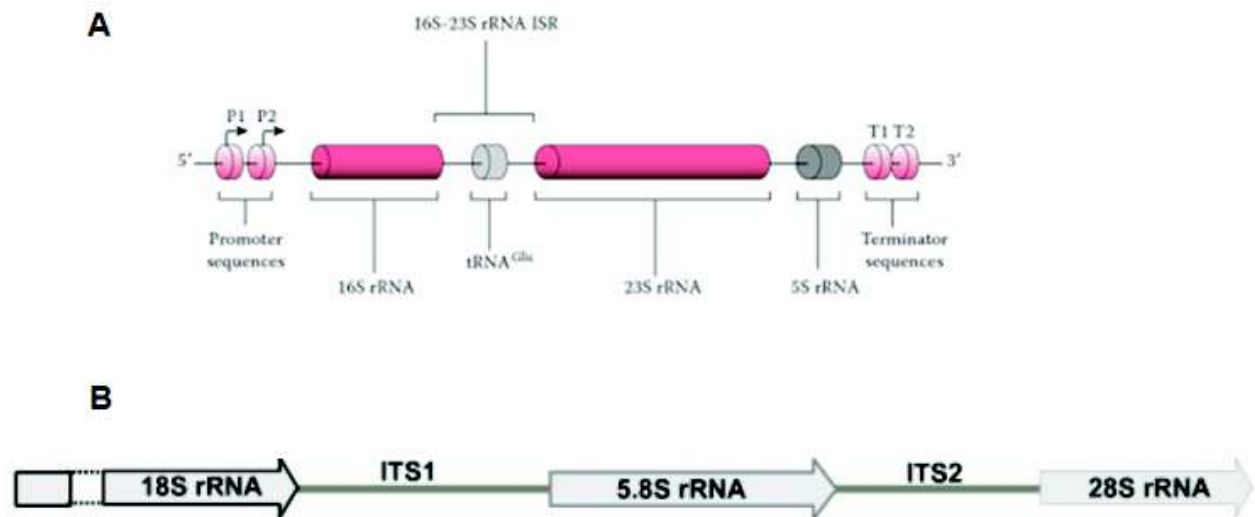


Figure 1.6. Organisation typique des gènes d'ARNr chez (A) les procaryotes et (B) les eucaryotes.

(A) Représentation de l'opéron codant les ARNr d'*E. coli*, 5S 16S et 23S (Li, 2015).

(B) Représentation de la portion ARNr fongiques étudiée durant cette thèse : ARNr 5S, 18S et 28S. Ces derniers étant séparés par les régions intergéniques ITS1 et ITS2 (Embong *et al.*, 2008).

Les marqueurs moléculaires doivent donc posséder certains critères pour pouvoir être utilisés efficacement : être ubiquistes et remplir la même fonction, avoir une évolution lente, posséder des domaines hautement conservés avec peu de mutations fixées au cours de l'évolution (ces régions conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" lors des amplifications par PCR et pour le séquençage) et posséder également des régions variables (encadrées par les régions conservées) dont la similarité entre deux espèces baisse lorsque celles-ci sont phylogénétiquement éloignées. Différents outils moléculaires consistant à utiliser ces marqueurs ont été développés pour pouvoir accéder à différents niveaux d'information sur les communautés microbiennes complexes (du global, permettant ainsi de connaître les dynamiques d'évolution et de modification des microorganismes, au spécifique pour pouvoir identifier de manière précise les microorganismes d'intérêt dans un environnement complexe). Les étapes sont similaires, elles consistent dans un premier temps à procéder à l'amplification par PCR en ciblant les régions variables de l'ADN par l'utilisation d'amorces qui vont s'hybrider sur les régions conservées, puis au séquençage de ce(s) gène(s) et comparaison avec des séquences déjà connues disponibles dans les banques de données (GenBank, RDP, SGD...).

1.3.2.4. La PCR-DGGE : principe et applications

L'électrophorèse sur gel avec gradient dénaturant (DGGE) fait partie des techniques les plus couramment utilisées parmi les techniques d'empreinte moléculaire en écologie microbienne. Elle est basée sur la séparation électrophorétique de fragments d'ADN préalablement amplifiés par PCR dans un gel contenant un gradient dénaturant en urée et en formamide.

Les fragments d'ADN double brins obtenus après amplification par PCR sont de tailles identiques mais possèdent une séquence ADN différente. Dans le gel d'acrylamide, ces fragments d'ADN double brins sont soumis, à mesure de leur migration, à un environnement dénaturant linéaire et croissant présent dans le gel DGGE. Ils vont alors se dénaturer en fonction de leur composition en bases AT (Adénine-Thymine) et GC (Guanine-Cytosine). Cette dynamique de dénaturation est également dépendante de la présence de domaines de fusion et donc de l'enchaînement des bases dans les séquences d'ADN. Ce comportement va alors réduire la mobilité de l'ADN dans le gel d'acrylamide. Par conséquent, des fragments d'ADN de la même taille, mais de séquence différente, migreront plus ou moins loin dans le gel. Afin d'éviter que cette dénaturation ne soit complète, une structure à très haute température de fusion appelée GC-clamp (qui correspond à une série de G et de C d'une taille de 30 à 40 nucléotides) est ajoutée pour l'amplification par PCR (Sheffield *et al.*, 1989). On obtiendra alors *in fine* des profils génétiques microbiens (bactéries, levures ou moisissures selon le couple d'amorces utilisé durant la PCR) spécifiques de l'échantillon étudié (Figure 1.7.).

Chaque profil est caractérisé par la présence d'une série de bandes qui correspondent à différentes espèces microbiennes de cet échantillon. Lorsque des amorces universelles sont utilisées pour l'amplification par PCR, l'ensemble des bandes présentes dans le gel DGGE représentera alors la flore microbienne globale d'un échantillon donné. Ces bandes peuvent être récupérées du gel pour ensuite identifier l'espèce microbienne correspondante par séquençage.

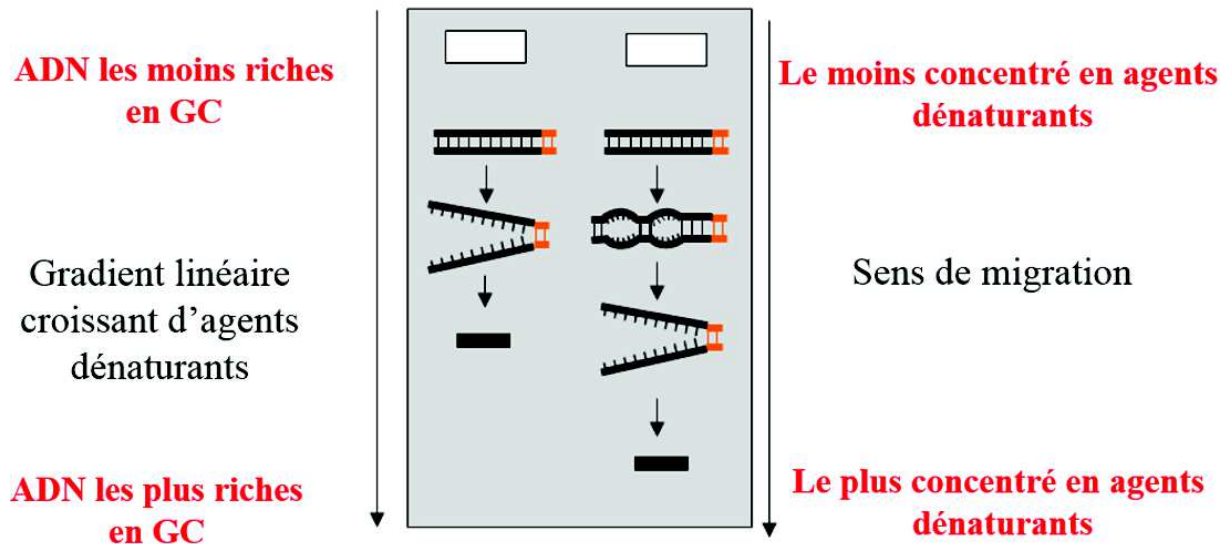


Figure 1.7. Schéma du principe de la PCR-DGGE :
dénaturation progressive des fragments d'ADN.

La méthode PCR-DGGE utilisant l'ADNr a été introduite dans l'écologie microbienne par **Muyzer *et al.* (1993)**. Jusqu'à présent, de nombreux travaux ont eu recours à cet outil, de sorte qu'il est devenu un outil de choix pour l'étude de la diversité microbienne dans des environnements complexes divers. En effet, la littérature décrivant l'application de la PCR-DGGE en microbiologie est extrêmement large. De fait de sa facilité d'application, cette technique d'empreinte a été utilisée avec succès dans de nombreux domaines de l'écologie microbienne. Les premières applications de cette technique visaient à étudier la structure et l'évolution des communautés microbiennes dans l'environnement : le sol (**Norris *et al.*, 2002** ; **Avrahami *et al.*, 2003** et **Nicol *et al.*, 2003**), l'eau (**Bano & Hollibaugh, 2002** ; **Crump *et al.*, 2003** ; **Sekiguchi *et al.*, 2002**) le tractus gastro-intestinal (**Zoetendal *et al.*, 2002**), les bioréacteurs de traitement des eaux usées (**Gray *et al.*, 2002** et **Stamper *et al.*, 2003**), les insectes (**Reeson *et al.*, 2003**) et les échantillons cliniques (**Burton *et al.*, 2003**, **Donskey *et al.*, 2003** et **Mc Bain *et al.*, 2003**). Elle a été également utilisée comme outil pour l'identification et le typage des entités microbiennes (**Nielsen *et al.*, 2000** ; **Theelen *et al.*, 2001** ; **Gurtler *et al.*, 2002**).

Malgré le large contexte d'applications, cette technique n'a été introduite que récemment en microbiologie alimentaire. Le grand potentiel dont a fait preuve cet outil dans l'analyse des échantillons environnementaux a stimulé les microbiologistes travaillant dans l'agroalimentaire pour étudier la pertinence de la PCR-DGGE pour l'analyse des

microorganismes associés aux aliments, en particulier dans les produits fermentés (**Cocolin et al., 2001** ; **Meroth et al., 2003** ; **Ercolini, 2004** ; **Dalmacio et al., 2011** ; **Moroni et al., 2011** ; **Cocolin et al., 2013** ; **Hamdouche et al., 2015**). En effet, la DGGE est l'outil le plus employé pour l'étude de l'écologie microbienne des produits fermentés : le vin (**Bokulich et al., 2012** ; **González et al., 2013**), la viande (**Ercolini et al., 2006** ; **Hu et al., 2009**), le lait et les produits laitiers (**Porcellato et al., 2012** ; **Delgado et al., 2013**) étant les plus fréquemment étudiés. Cependant, très peu d'études utilisant la PCR-DGGE ont porté sur la flore microbienne des fruits frais (et produits frais en général). Ces dernières sont surtout concentrées sur les fruits en post-récolte (**Pulido et al., 2005** ; **Le Nguyen et al., 2008** ; **El Sheikha et al., 2011** ; **Randazzo et al., 2012**).

Bien que la PCR-DGGE fasse partie des techniques d'empreintes moléculaires qui offrent le meilleur compromis entre le nombre d'échantillons à traiter et la richesse de l'information obtenue, elle présente néanmoins certaines limites :

- 📊 Limites pratiques : relatives aux conditions expérimentales (conditions d'extraction des ADN, amorces, conditions d'amplification par PCR, conditions de dénaturation...). Également, la co-migration des fragments d'ADN de séquences différentes rend délicate l'identification de certaines bandes ADN.
- 📊 Limites et biais d'interprétation : erreurs liées à la subjectivité de l'analyse des gels. Par exemple, lors de la lecture des gels, certaines traces peuvent être associées à tort à des bandes de faible intensité. De plus, une saturation du signal liée au mode de coloration ne permet pas d'évaluer correctement l'abondance relative de fragments fortement amplifiés.
- 📊 Limites de détection : cette technique ne permet pas d'avoir une évaluation des communautés microbiennes totales car elle favorise les espèces majoritaires. De plus, la longueur des fragments d'ADN double brins ne devant pas dépasser les 500 paires de bases (pb), l'analyse des séquences et l'identification fiable des espèces microbiennes sont donc limitées (**Ercolini, 2004**).

Les biais évoqués ci-dessus ne remettent pas en cause l'intérêt de la PCR-DGGE dans le domaine de l'écologie microbienne. La richesse de l'information qu'il est possible d'obtenir par cette méthode permet de contribuer de façon non-négligeable à l'amélioration de nos connaissances sur les communautés microbiennes des aliments, et dans notre cas ceux issus

de l'AB. Mais, malgré la puissance et l'efficacité de la technique, elle n'en demeure pas moins perfectible et sujette à certaines limites qu'il est nécessaire de connaître.

1.3.2.5. La PCR quantitative en temps réel (qPCR) couplée à la HRM

La qPCR est une méthode qui repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus d'amplification par PCR à l'aide de la fluorescence puis de quantifier l'ADN présent dans l'échantillon initial étudié. Elle bénéficie de nombreux avantages par rapport à la PCR classique, notamment en termes de rapidité, de sensibilité et de reproductibilité. Elle offre également la possibilité de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons dans des conditions standardisées. Ces divers avantages justifient son utilisation pour l'étude des écosystèmes microbiens (**Smith & Osborn, 2009**). Certaines limitations et biais doivent cependant être pris en considération lors de l'application de cette méthode, et donc lors de l'interprétation des résultats. En particulier le fait que l'efficacité de la détection d'une espèce bactérienne ou fongique dans un échantillon donné est conditionnée par l'efficacité de la méthode d'extraction, par l'efficacité des enzymes ou encore par la nature des marqueurs génétiques choisis.

Il existe plusieurs systèmes de détection et de quantification. Ils sont divisés en 2 groupes : les agents intercalants (actuellement, l'agent intercalant le plus utilisé est le SybrGreen) et les sondes (Taqman, FRET, Molecular Beacons et sondes Scorpions). Le fluorophore utilisé pour notre étude est le SybrGreen. Ce dernier s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice d'ADN et fluoresce lorsque l'ADN est sous-forme double brins (à l'état libre il ne fluoresce quasiment pas). Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant (**Figure 1.8**).

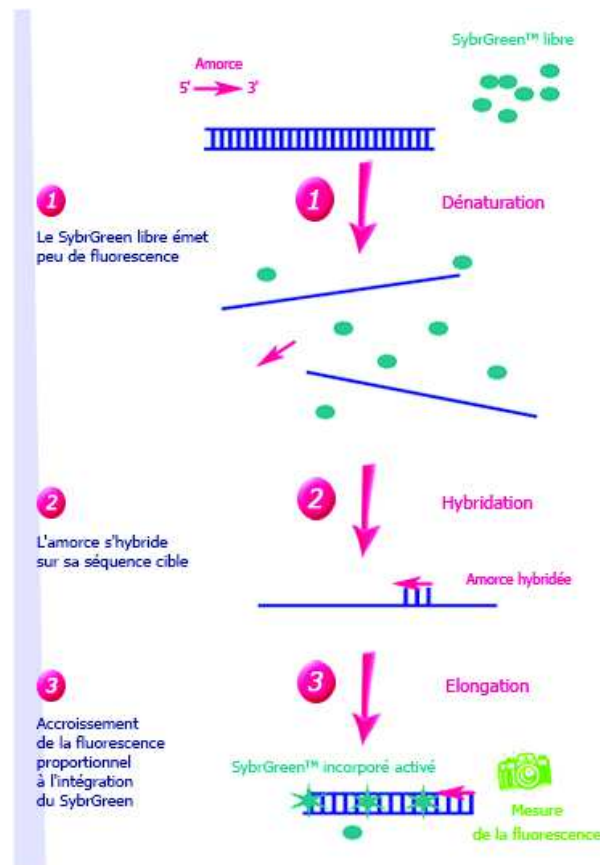


Figure 1.8. Étapes de la PCR quantitative en temps réel avec utilisation du SybrGreen.

Source : www.ilm.pf/PCRtempsreel

Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une fluorescence donnée (phase log-linéaire) est fonction du nombre d'ADN cibles initialement présents. Plus l'échantillon étudié sera concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent sera détecté, et donc significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme étant le *Cycle threshold* (ou Ct) et apparaît en début de phase exponentielle. Les valeurs de fluorescence sont relevées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction.

La qPCR se caractérise par 3 étapes distinctes : i) la phase de bruit de fond (ou phase de latence) où la quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond, ii) la phase exponentielle où la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection et double à chaque cycle jusqu'à atteindre la iii) phase plateau (ou de saturation) qui correspond au moment où les composants de la réaction (et en particulier l'enzyme) deviennent limitants.

L'approche de qPCR/HRM a été introduite pour la première fois en 2003 par Idaho Technology à l'Université d'Utah et a depuis été largement appliquée dans de nombreux domaines. Le principe de la HRM repose sur la capacité de l'ADN double brin à se dénaturer dans des conditions de température élevée. En effet, après PCR, les amplicons sont chauffés très progressivement (de 50 à 95°C environ) et vont se dénaturer peu à peu en fonction de leur domaine de fusion. Cette dénaturation va alors entraîner la libération du fluorochrome et donc la diminution de la fluorescence jusqu'à son extinction totale lorsque la dénaturation sera complète. Chaque séquence d'ADN particulière aura alors une signature lumineuse qui lui sera propre, représentée par une courbe de fusion (**Figure 1.9.**) obtenue en représentant la fluorescence en fonction de la température. Cette courbe de fusion sera dépendante de la séquence ADN, de sa taille et de sa composition en G et C. Ainsi, si la séquence d'ADN analysée comporte des mutations, des délétions ou des variants, la signature lumineuse sera différente. La forme de la courbe de fusion et la température maximale de dissociation (pic de fusion ou T_m) sont donc de précieux indicateurs pour l'étude des différences au niveau des séquences d'ADN d'intérêt. Les produits d'amplification doivent avoir des séquences courtes, de taille comprise entre 100 et 250 pb (toujours inférieure à 500 pb) car un amplicon de grande taille peut avoir plusieurs domaines de fusion.

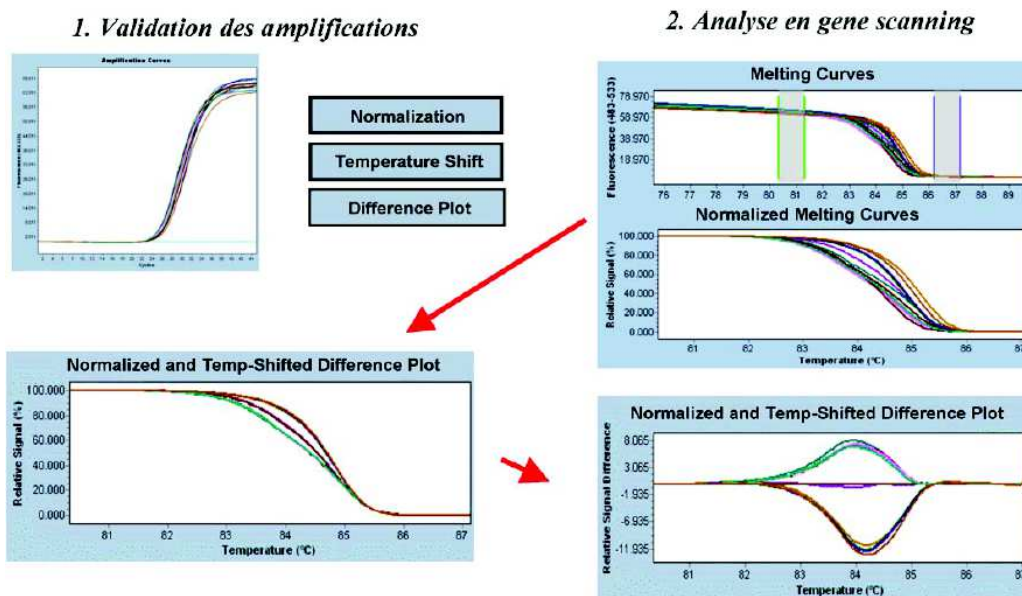


Figure 1.9. Étapes de la qPCR-HRM pour la détection de mutations.
(Chomarat *et al.*, 2011)

1/ PCR en temps réel permettant de valider les amplifications, 2/ Normalisation des courbes de fusion obtenues par HRM (post-PCR) puis analyse des différences dans la forme des courbes de fusion (« difference plot ») en soustrayant une courbe de référence (par exemple, la courbe correspondant à une souche sauvage par rapport à des souches mutées).

La méthode de HRM a été aussi bien appliquée dans le domaine de la génétique microbienne que de la génétique humaine (Reed *et al.*, 2007). L'utilisation des courbes de fusion comme empreintes moléculaires pour l'identification des espèces microbiennes a été initiée par Cheng *et al.* (2006). À travers leur étude, ils ont pu réaliser la distinction entre 25 bactéries pathogènes avec 94% de précision. Depuis lors, d'autres équipes de recherche ont appliqué cette technique pour identifier différentes espèces microbiennes, en particulier les bactéries pathogènes (Simenc & Potocnik, 2011 ; Kagkli *et al.*, 2012). Elle a également été appliquée en virologie pour la détection et le génotypage de norovirus (Tajiri-Utagawa *et al.*, 2009) ou encore pour l'analyse des gènes mutants impliqués dans certains cancers (Wiechec *et al.*, 2010). À l'image de la DGGE, la HRM permet également de fournir un profil génétique microbien spécifique d'un échantillon donné, sans les étapes de migration et de séparation des produits PCR qui sont longues et lourdes.

Ainsi, la HRM est une cinétique de fusion de l'ADN à haute résolution permettant l'étude de la diversité des communautés microbiennes par l'identification de variations dans les séquences d'acides nucléiques. Cette technique est rapide, facile à utiliser et est considérée comme étant un outil peu onéreux comparé à d'autres approches comme le séquençage (Wittwer, 2009).

1.3.2.6. Les technologies de séquençage à haut débit

Les techniques basées sur l'étude de l'ADN ont permis une grande avancée des connaissances des communautés microbiennes associées à des échantillons environnementaux. Les analyses des génomes de souches microbiennes individuelles ou l'utilisation des approches de métagénomique sur les communautés microbiennes globales donnent un aperçu de la composition et du potentiel physiologique des microbiotes associés à l'aliment. Le microbiote est le génome de l'ensemble des microorganismes (ou métagénome) qui constituent une communauté microbienne. Les études basées sur l'ARN permettent d'étendre les connaissances du métagénome afin d'élucider les activités métaboliques réelles et les mécanismes de régulation des cellules microbiennes dans des conditions données. Les outils de séquençage de nouvelle génération NGS (appelés également technologies de deuxième ou de troisième génération) ont eu un impact conséquent sur les méthodes d'analyse basées sur l'ADN et l'ARN, et ont ainsi révolutionné le domaine de la microbiologie moléculaire ces dernières décennies. Les analyses NGS fournissent une description complète des ADN microbiens d'un aliment donné en générant des millions de séquences (régions

ciblées par des amorces ADN spécifiques) en un seul run et à faible coût. Les technologies NGS se caractérisent par l'utilisation d'approches massivement parallèles, permettant ainsi de séquencer des centaines de milliers de fragments de façon simultanée en s'affranchissant des étapes de clonage ou de criblage de banques génomiques. Elles permettent de trouver des réponses à des questions qui ne pouvaient être abordées avant, largement en raison des limites techniques, mais aussi financières. Les associations microbes/aliments peuvent désormais être étudiées à une vitesse et une précision comme jamais atteintes auparavant. Cela a conduit à un renouvellement récent de l'étude des communautés microbiennes de la phyllosphère par la mise en place de ces analyses moléculaires à haut débit. Ces analyses sont surtout basées sur l'utilisation de marqueurs taxonomiques conservés (**Delmotte *et al.*, 2009 ; Knief *et al.*, 2012**).

Très peu d'études s'appuient sur l'utilisation de gènes essentiels (liés à un processus de régulation, d'adaptation...) ou un séquençage direct d'ADN métagénomique (**Voříšková & Baldrian, 2013**). Ces approches de séquençage à haut débit permettent soit de séquencer des produits amplifiés par PCR (régions codantes de l'ARNr, comme la région 16S pour les bactéries et la région ITS pour la flore fongique principalement) soit de séquencer directement l'ADN de communautés entières présentes dans un environnement particulier en s'affranchissant des étapes d'amplification. Cette approche fait appel aux technologies NGS de 3^{ème} génération (non commercialisées à l'heure actuelle) et permet de se rapprocher le plus possible de l'état natif du métagénome de l'échantillon.

Depuis 1977, où les premiers brins d'ADN ont été séquencés (**Sanger *et al.*, 1977 ; Maxam & Gilbert, 1977**), les technologies de séquençage ont très rapidement évolué et sont devenues accessibles pour la majorité des équipes de recherche. Les technologies NGS sont apparues depuis 2005 et présentent de nouvelles générations environ tous les 4 ans. Les améliorations apportées sur ces générations étaient dans un premier temps concentrées sur l'augmentation de la longueur de lecture et de la profondeur du séquençage pour se focaliser aujourd'hui davantage sur la réduction des coûts et des biais de l'analyse mais aussi sur l'amélioration de la rentabilité de l'investissement des appareillages et leur miniaturisation. A l'heure actuelle, il existe 5 principaux types de technologies NGS de « 2^{ème} génération ». Elles se démarquent les unes des autres par les chimies qui les constituent : le pyroséquençage (454/Roche), le séquençage avec des terminateurs réversibles (Illumina/Solexa), le séquençage par ligation (SOLiD), le séquençage par ions semi-conducteurs (Ion Torrent) et

enfin le séquençage en temps réel de molécules uniques (PacBio) (**Metzker, 2010 ; Champomier-Vergès & Zagorec, 2015**). Le choix de la technologie et de la méthode dépend du type (ou de la complexité) de matrice à étudier (échantillon clinique, aliment...) et du but de l'étude. Mais ces différentes technologies présentent des étapes communes pouvant se résumer de la façon suivante : préparation d'une banque d'ADN simple brin associés à des adaptateurs, amplification des ADN puis séquençage. Les données obtenues sont ensuite analysées en utilisant des logiciels de bioinformatique (mothur, Qiime, MEGAN...) qui permettent le traitement, l'alignement, l'assemblage et la comparaison statistique des séquences ADN/ARN. Des bases de données (de référence et/ou créées par le laboratoire) sont ensuite utilisées pour l'attribution des taxons. Le développement constant et rapide des outils bioinformatiques et la quantité croissante de données disponibles contribuent à enrichir et à accroître la fiabilité des bases de données de métagénomique dédiées (**Van Hijum et al., 2013**).

2. Matériels et Méthodes

-
-
-



2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. MATÉRIELS BIOLOGIQUES

2.1.1. Souches microbiennes utilisées durant cette étude

Les différentes souches de référence de levures et de bactéries utilisées durant cette étude sont listées dans le **Tableau 2.1.**

Tableau 2.1. Souches microbiennes utilisées durant cette étude.

| Espèce | Origine | Numéro d'accession |
|---|--------------|--------------------|
| <i>Candida apicola</i> souche CBS 4078 | UMR Qualisud | EU926481.1 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> souche Kw3074-14 | UMR Qualisud | LN827703.1 |
| <i>Escherichia coli</i> souche K-12 MG1655 | UMR Qualisud | NC_000913.3 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 | UMR Qualisud | NC_004567.2 |

2.1.2. Échantillonnage de fruits

L'échantillonnage est une étape cruciale car les échantillons doivent être les plus représentatifs possible de l'environnement dans lequel ils ont été prélevés. Tous les fruits qui ont été étudiés durant ma thèse ont été échantillonnés pendant la période de récolte, avec des gants et des sacs stériles²⁰ (Whirl-Pak® bags) (**Figure 2.1.**), sauf les pêches et les nectarines du CTIFL²¹ qui ont été prélevées dans des conditions classiques (sans gants ni sacs stériles).

²⁰ Un fruit par sac et changement de gant entre chaque prélèvement.

²¹ Centre Technique Interprofessionnel Fruits Légumes.

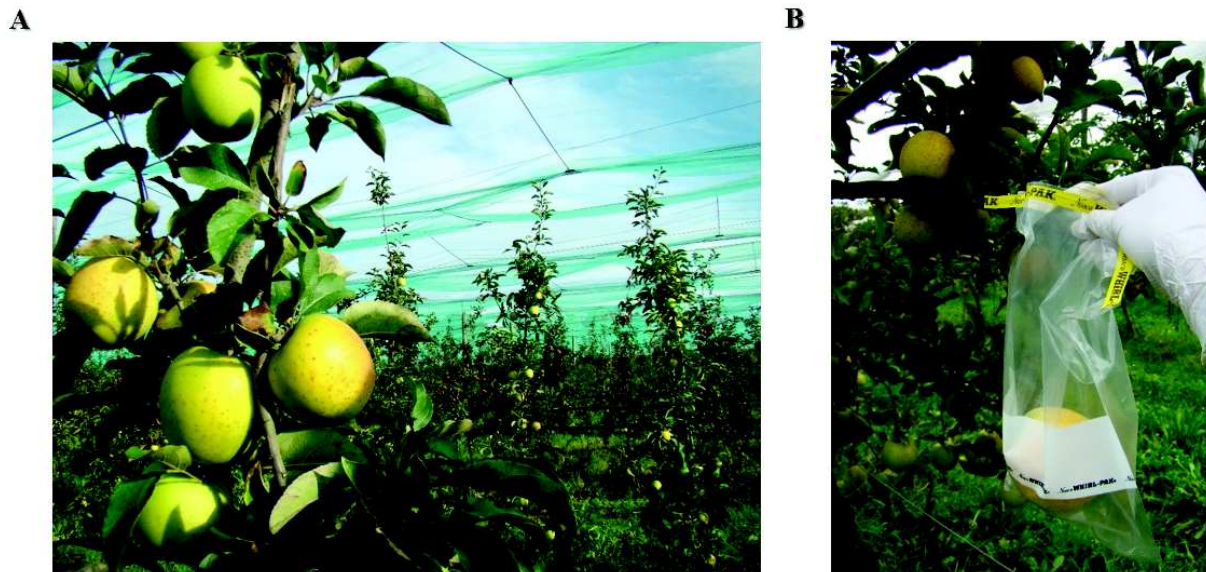


Figure 2.1. Échantillonnage des fruits : exemple des pommes d'Invenio.

A) Les vergers de pommiers sont protégés par un filet permettant d'assurer une protection contre les insectes, les oiseaux ou encore la grêle.

B) Un fruit par sac, récolté stérilement (avec gants et sacs prévus à cet effet).

Les échantillons bio et conventionnels étaient de même variété et de même origine géographique (parcelles très proches), si possible du même producteur. Ceci afin de s'affranchir des biais pouvant influencer significativement la flore microbienne des fruits et ainsi ne mesurer que l'impact des traitements sur cette microflore.

2.1.2.1. Les pommes

Des pommes conventionnelles et bio ont été cultivées et échantillonnées au Centre de recherche et d'expérimentation de la filière Fruits et Légumes d'Aquitaine (Invenio) sur deux années. Tous les fruits étaient de la variété « Goldrush » et les parcelles étaient séparées d'une distance d'environ 15 km (**Figure 2.2., Tableau 2.2.**). La parcelle bio était entourée d'arbres alors que les parcelles conventionnelles (2013 et 2014) ainsi que la parcelle n°2 bio étaient plus proches des routes, surtout la parcelle conventionnelle de deuxième année de récolte où les pommiers d'un des côtés de la parcelle (Fongrave) jalonnaient le bord de la route.

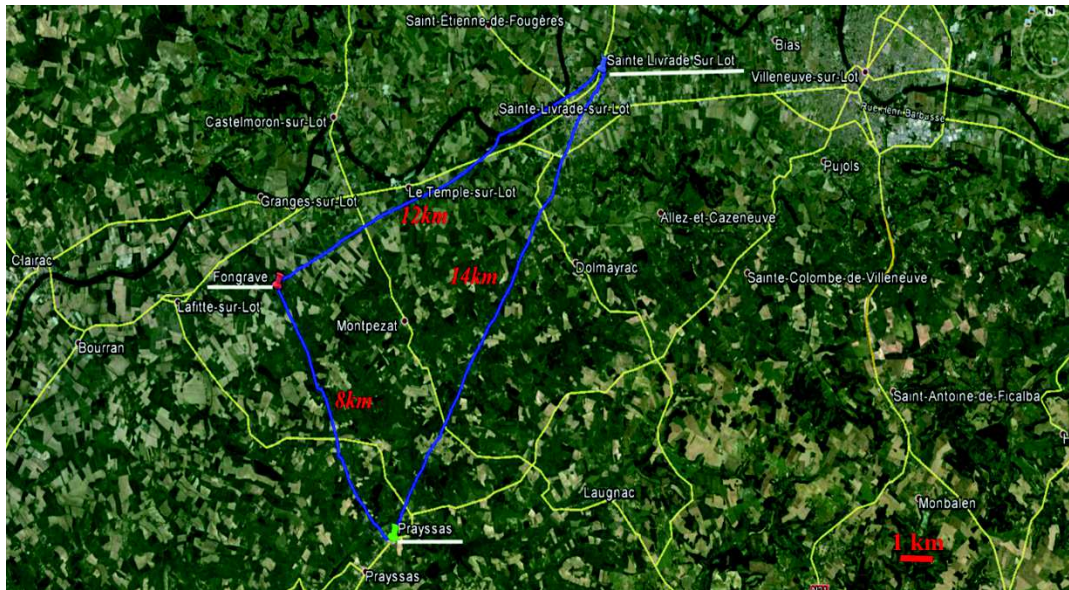


Figure 2.2. Situation géographique des lieux de prélèvements des pommes biologiques et conventionnelles des différentes parcelles étudiées. (— Routes)

Prayssas : parcelles biologiques et conventionnelles 2013.

Fongrave : parcelle conventionnelle 2014.

Sainte Livrade Sur Lot : parcelle biologique n°2 (2014).

Tableau 2.2. Données géographiques et techniques des lieux de récolte des pommes.

| Localisation | Agriculture | Échantillonnage | Total (n pommes) | GPS | |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|---------------|--------------|
| Fongrave | Conventionnelle depuis 2005 | 2014 | 30 | 44°21'13.79"N | 0°28'16.93"E |
| Prayssas (site "Petit Carrère") | Conventionnelle depuis 1999 | 2013 | 30 | 44°17'39.25"N | 0°31'6.69"E |
| Prayssas (site "Petit Tillole") | Biologique depuis 2000 | 2013/2014 | 60 | 44°17'39.25"N | 0°31'6.69"E |
| Sainte Livrade ("Parcelle 2") | Biologique depuis 2011 | 2014 | 5 | 44°24'23.10"N | 0°36'1.99"E |

125 échantillons ont été collectés : 30 pommes bio et 30 pommes conventionnelles la première année (25 novembre 2013) sur les parcelles de Prayssas ; 35 pommes bio (même parcelle de Prayssas) et 30 pommes conventionnelles (parcelle d'un agriculteur à Fongrave) la deuxième année (12 novembre 2014). Parmi les 35 fruits bio prélevés en 2014, 5 ont été cueillis dans chaque zone d'une seconde parcelle (parcelle de Sainte Livrade Sur Lot, 4 fruits prélevés sur chacun des bords et 1 fruit au centre) afin de tester la robustesse de notre approche. En outre, pour chaque parcelle et pour les deux années d'échantillonnage, la moitié des fruits ont été prélevés dans le centre et l'autre moitié sur le bord des parcelles. En raison de l'impossibilité d'échantillonner des pommes conventionnelles sur la même parcelle que la première année, durant la deuxième année de récolte, les fruits provenaient d'une parcelle

conventionnelle d'un agriculteur voisin (EARL Les Vergers de Roussel à Fongrave). Les fruits étaient cependant toujours de même variété et de même origine géographique.

2.1.2.2. Les pêches et nectarines

2.1.2.2.1. Coopérative Saveurs des Clos

Des nectarines et des pêches ont été récoltées en août 2011 au sein de la coopérative française "Saveurs des Clos" (Ille sur Têt) directement dans le verger ou dans des plateaux stockés à 1°C dans la coopérative (pendant quinze jours pour les fruits durables, une journée pour les fruits bio et neuf jours pour les fruits conventionnels). Les fruits bio étaient stockés dans une chambre différente des deux autres types de fruit. Tous ces fruits sont de la même origine géographique (parcelles à proximité) (**Figure 2.3., Tableau 2.3.**) et de la même variété : les pêches jaunes étaient de la variété Corindon, les nectarines jaunes de la variété Ambre, à l'exception des nectarines conventionnelles récupérées sur les plateaux qui étaient de la variété Western Red. Les nectarines et les pêches blanches étaient respectivement des variétés Star Pearl et Amanda.

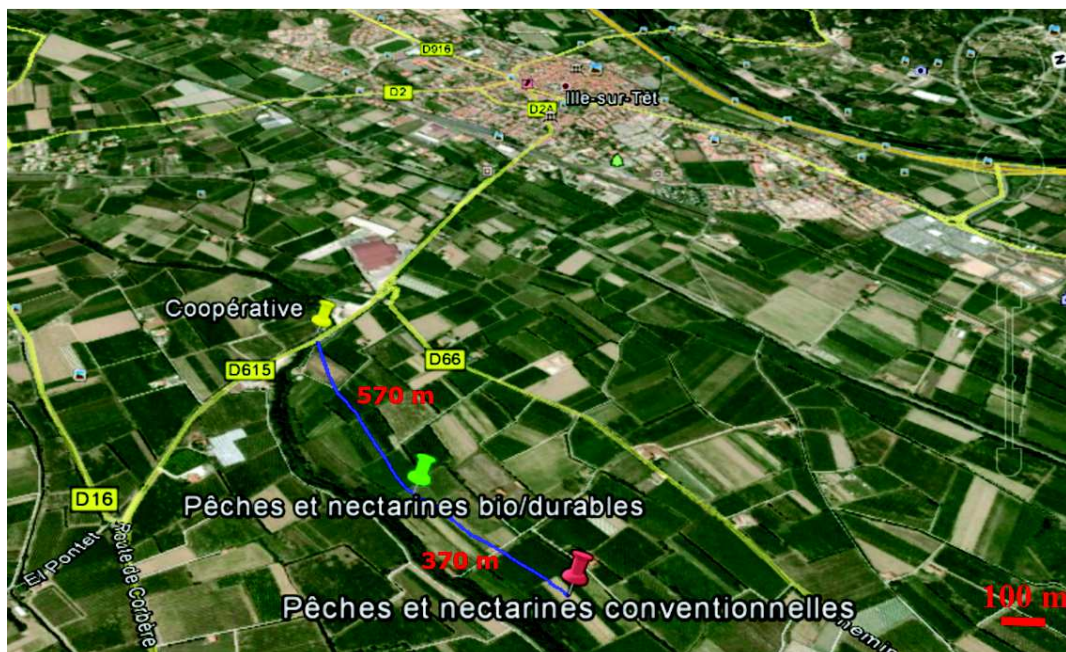


Figure 2.3. Situation géographique des lieux de prélèvements des pêches et nectarines issues de 3 modes de production (biologique, conventionnel et durable). (— Routes)

Tableau 2.3. Données géographiques et techniques des lieux de récolte des pêches et nectarines.

| Localisation | Agriculture | Fruit | Total (n fruits) | GPS | |
|--------------|-----------------|-------------------|---------------------|---------------|--------------|
| Verger | Biologique | Pêches/Nectarines | 14 | 42°39'46.88"N | 2°38'32.36"E |
| Verger | Conventionnelle | Nectarines | 10 | 42°39'53.62"N | 2°38'46.30"E |
| Plateau | Durable | Pêches/Nectarines | 8 | 42°39'43.87"N | 2°38'7.49"E |
| Plateau | Biologique | Pêches/Nectarines | 8 | 42°39'43.87"N | 2°38'7.49"E |
| Plateau | Conventionnelle | Pêches/Nectarines | 8 | 42°39'43.87"N | 2°38'7.49"E |

L'ensemble des fruits échantillonnés était issu de trois modes de production : AB (certifiée), conventionnelle et durable (mise en place par la coopérative comme agriculture raisonnée avec des quantités réduites d'intrants chimiques). Pour chaque condition, au moins quatre fruits ont été échantillonnés et analysés afin de nous assurer de la reproductibilité de notre approche.

2.1.2.2.2. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL)

Des échantillons de pêches (variété Royal Pride) et de nectarines (variété Tiffany) ont été récoltés le 28 juillet 2014 par le CTIFL de Bellegarde (Centre de Balandran) et placés dans des plateaux avant d'être amenés au Cirad de Montpellier. Ces échantillons nous ont uniquement servi pour des tests de conservation d'extraits avant extraction des ADN (la récolte a été réalisée sans gants ni sacs stériles) : l'idée était de comparer l'effet de 3 types de préparation des échantillons sur les résultats d'écologie microbienne que l'on peut générer, aussi bien sur les rendements d'extraction d'ADN que sur la diversité microbienne retrouvée (profils DGGE). Cela nous a permis de savoir s'il était possible de conserver des extraits pour des extractions d'ADN dans le cas où il n'est pas possible de les réaliser dès réception des échantillons. 15 pêches et 15 nectarines ont été analysées, soit 5 pêches et 5 nectarines par modalité pour estimer la variabilité inter-fruit.

2.1.2.3. Les bananes

2.1.2.3.1. De Martinique

Le choix de la banane de Martinique est justifié par le fait que le CIRAD possède ses propres parcelles expérimentales de bananes. Du personnel de l'UMR Qualisud en Martinique a pu réaliser les prélèvements et préparer les échantillons provenant de différents itinéraires

techniques. De plus, le Cirad a créé un hybride résistant (nommé CIRAD 925) qui ne nécessite pas de traitements contre la cercosporiose. Il était donc intéressant de travailler sur cette variété, dont les pratiques agricoles au champ sont différentes de la Cavendish et se rapprochent des conditions de l'AB.

L'Institut Technique Tropical de la banane implanté aux Antilles (Martinique, Guadeloupe) a pu nous conseiller sur les meilleurs sites de prélèvements. Le groupement de producteurs BANAMART nous a également informés sur les pratiques des producteurs.

Après trois mois aux champs, les fruits ont été échantillonnés au centre des parcelles au moment de la récolte qui varie selon la variété (**Tableau 2.4.**).

Tableau 2.4. Description des échantillonnages des bananes de Martinique.

| Variétés | Régimes | IFC* (jours) |
|----------|---------|--------------|
| 925 | 1 | 88 |
| | 2 | 85 |
| | 3 | 85 |
| | 4 | 85 |
| CB | 1 | 94 |
| | 2 | 94 |
| | 3 | 60* |
| CC | 1 | 83 |
| | 2 | 83 |
| | 3 | 83 |
| | 4 | 83 |
| | 5 | 83 |

*Intervalle Floraison-Coupe

*Récoltées plus tôt car les autres bananes de la parcelle étaient contaminées par la cercosporiose

Les prélèvements ont été réalisés sur trois types de bananes du même producteur (Eyma au nord de la Martinique situé à Basse-Pointe) : CIRAD 925 non-traitées (925), Cavendish non traitées (« biologiques »²²) (CB) et Cavendish traitées (conventionnelles) (CC), gainées dans les 3 cas (gainées placées une semaine après l'apparition du fruit). Les parcelles sont situées à une distance d'environ 500 m l'une de l'autre (**Figure 2.4., Tableau 2.5.**). Les bananes Cavendish non-traitées (CB) ont été cultivées sur la même parcelle que la variété 925

²² N'ont pas de certification et n'ont pas reçu de traitements herbicides. Pour des facilités au niveau des interprétations et éviter des confusions on parlera de Cavendish non-traitées (sous-entendu non-traitées avec des fongicides).

pour servir de témoin de contamination à la cercosporiose et ainsi tester la résistance de la 925 contre cette maladie fongique. Cette parcelle 925/CB était en effet une parcelle expérimentale isolée des autres parcelles. Sur la photo de la **Figure 2.4.**, elle semble être entourée par d'autres parcelles mais, à la période où nos échantillons ont été prélevés, cette parcelle expérimentale était isolée à proximité d'une forêt sans routes autour. De plus, aucun épandage aérien n'était autorisé sur cette parcelle.

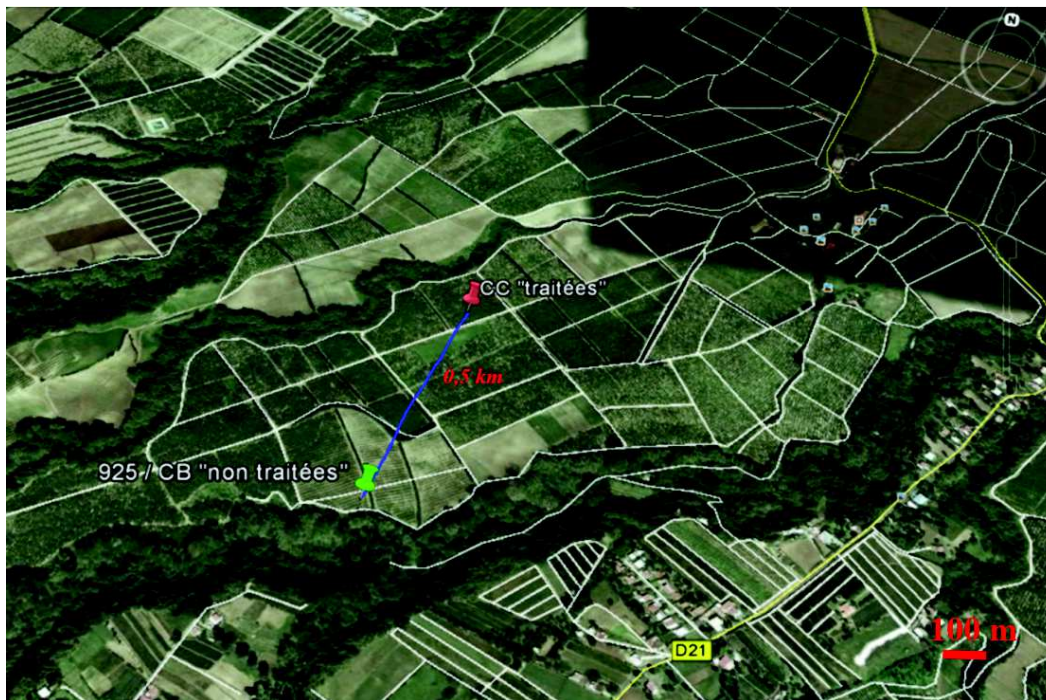


Figure 2.4. Situation géographique des lieux de prélèvements des bananes chez le producteur Eyma au nord de la Martinique et situé à Basse-Pointe. (— Routes).

925 : variété résistante à la cercosporiose et non-traitée aux fongicides.

CB : variété Cavendish non-traitée aux fongicides (« biologique »)

CC : variété Cavendish non-traitée aux fongicides (conventionnelle)

Tableau 2.5. Données géographiques et techniques des lieux de récolte des bananes.

| Localisation | Type | Échantillonnage | Total (n bananes) | GPS | |
|--------------|------------------------------|-----------------|----------------------|---------------|---------------|
| Basse-Pointe | CIRAD 925 | 2013 | 16 | 14°50'26.74"N | 61° 7'14.90"O |
| Basse-Pointe | Cavendish « non-traitée » | 2013 | 15 | 14°50'26.74"N | 61° 7'14.90"O |
| Basse-Pointe | Cavendish Conventionnelle | 2013 | 15 | 14°50'41.45"N | 61° 7'10.10"O |

Concernant les modalités d'échantillonnages (**Tableau 2.4.**), les bananes ont été récoltées sur différents régimes sur 2 parcelles différentes. La variété Cavendish non-traitée était cultivée sur la même parcelle que la variété 925 :

- 🌿 Variété CIRAD 925, 4 bananes par régime ont été récoltées sur 4 régimes au total.
- 🌿 Variété Cavendish et non-traitée (CB), 5 bananes par régime sur 3 régimes.
- 🌿 Variété Cavendish conventionnelle (CC), 3 bananes par régime sur 5 régimes.

2.1.2.3.2. De République Dominicaine

Après 10 semaines au champ, les bananes ont été échantillonnées durant deux années successives : le 13 juin 2013 et le 17 juin 2014. Ceci, afin de mesurer les variations au niveau de la structure des communautés microbiennes de ces fruits selon leur année de récolte. Elles étaient toutes de variété Cavendish, la moitié (n=15) issue de l'AB (parcelle située à La Caida, Mao) et l'autre moitié (n=15) de l'agriculture conventionnelle (parcelle située à Boca de Mao, Mao). En raison de l'abandon de la culture en AB du producteur, durant la deuxième année de récolte, les fruits provenaient d'une parcelle bio d'un agriculteur voisin mais étaient toujours de variété Cavendish et de même origine géographique (La Caida, Mao). La distance entre les parcelles était d'environ 8 km (**Figure 2.5, Tableau 2.6.**).



Figure 2.5. Situation géographique des lieux de prélèvements des bananes de République Dominicaine. (— Routes).

La Caida, Mao : parcelles biologiques de 2013 et de 2014.

Boca de Mao, Mao : parcelles conventionnelle de 2013 et de 2014.

Tableau 2.6. Données géographiques et techniques des lieux de récolte des bananes.

| Localisation | Agriculture | Échantillonnage | Total (n bananes) | GPS | |
|------------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------|---------------|
| La Caida, Mao | Biologique | 2013/2014 | 30 | 19°35'23.52"N | 71°10'20.25"O |
| Boca de Mao, Mao | Conventionnelle | 2013/2014 | 30 | 19°35'16.46"N | 71° 2'40.57"O |

À chaque période d'échantillonnage, les deux types de fruits ont été prélevés sur 5 régimes à 3 niveaux différents : sur la partie supérieure, au centre et sur la partie inférieure du régime. Avec un fruit par partie, soit un total de 30 bananes par année de prélèvement en comptant les deux modes de production.

Entre le moment de la récolte des échantillons, leur envoi et la réalisation des extractions d'ADN, il s'est écoulé un délai de 10 jours. Durant ce délai, les échantillons étaient conservés en chambre froide à 13°C sans appliquer de traitements post-récolte.

Certaines bananes récoltées en juin 2014 ont été utilisées pour tester deux méthodes d'extraction d'ADN (au phénol/chloroforme et utilisation d'un kit, voir ci-dessous).

2.1.3. Les différents types de traitements phytosanitaires appliqués aux fruits étudiés

Selon les espèces fruitières, le nombre moyen de traitements phytosanitaires peut varier d'une dizaine à une quarantaine de traitements par an en France (<http://agreste.agriculture.gouv.fr>). Les conditions de traitements étant spécifiques au lieu géographique, elles peuvent varier de façon importante en fonction du type de fruit à traiter. Ceci est dépendant des conditions climatiques, des pressions parasitaires et des pratiques d'exploitation qui diffèrent d'un agriculteur à un autre. Les vergers de pommiers par exemple sont les plus sujets à ces disparités. Parmi les produits phytosanitaires, les fongicides et les bactéricides sont les plus appliqués. Quant aux traitements insecticides et acaricides, les pucerons figurent parmi les cibles principales. Les herbicides et les régulateurs de croissance ne représentent qu'une faible part des traitements.

Il a été possible d'avoir des informations très complètes sur les traitements et les parcelles de certains fruits, en particulier les pommes récoltées à Invenio. Pour les pêches et les nectarines, ces informations ne nous ont pas été communiquées.

2.1.3.1. Les pommes

La pomme est le fruit le plus consommé en France et en Europe (d'après les données 2014 de FranceAgriMer). Du fait que la pomme fait partie des fruits les plus périssables, et donc plus sujets aux contaminations, cela fait d'elle un des fruits nécessitant le plus de traitements pesticides. Elle doit en effet faire face à de nombreux bio-agresseurs, aidés parfois par les conditions climatiques et surtout par la sensibilité intrinsèque de certaines variétés de pommes à ces vecteurs pathogènes, parmi lesquels on peut citer : les champignons et les bactéries (pouvant être à l'origine de contaminations très variées comme la tavelure, l'oïdium, le chancre, la moniliose, le feu bactérien...), les parasites et les insectes (comme les acariens, le carpocapse, les pucerons, les cochenilles...). Les deux principales maladies fongiques de la pomme sont la tavelure et l'oïdium. À elles seules, ces maladies fongiques nécessitent au-delà de 15 traitements par an (**Durel *et al.*, 2009**), soit environ 70% des traitements, dont les deux tiers sont appliqués pour lutter contre la tavelure (**Hemelrijck *et al.*, 2012**). Au total, les pommes peuvent recevoir entre 30 et 40 traitements phytosanitaires par an (**Butault *et al.*, 2010**).

La variété étudiée durant cette thèse, la Goldrush, fait partie des variétés les plus résistantes à la tavelure et à l'oïdium (les variétés les plus cultivées en France, Golden, Gala et Granny Smith, font partie des plus sensibles à ce type de maladie). Les traitements qui ont été appliqués sur l'ensemble des pommes étudiées sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2.7. Traitements appliqués sur les pommes échantillonnées en 2013 et en 2014 : les molécules actives et leur rôle.

| Agriculture | Insecticides | Fongicides | Fertilisants | Herbicides | Bactéricides | Autres | |
|------------------------|---|---|---|---|--------------|----------------|--|
| 2013 | | Carpovirusine, Huile vaseline, Virus de la Granulose, Argile kaolin, Spinosad | Cuivre, Soufre, Hydroxyde de cuivre, Oxyde cuivreux, Laminarine | NPK - NF U42-001, Bore liquide, CaO | | Oxyde cuivreux | Barrières physiques (filets de protection autour des cultures) |
| | Biologique | | Mancozèbe, Dodine, Cyprodinil, Dithianon, Soufre, Thiophanate-méthyl, Thirame, Fenbuconazole, Captane, Difénoconazole, Laminarine, Rynaxypyr, Pyraclostrobine, Boscalid | Bore liquide, Nitrate de potassium, Sulfate de potassium d'ammonium | | | Barrières physiques (filets de protection autour des cultures) |
| | Conventionnelle | Lambda-cyhalothrine, Huile blanche, Acétamipride, Flonicamide, Spirotetramat, Thioclopride | | | | | |
| 2014 | | Huile vaseline, Virus de la Granulose | Soufre, Cuivre | Bore liquide | | | Barrières physiques (filets de protection autour des cultures) |
| | Biologique | | | | | | |
| | Biologique parcelle 2 | Huile vaseline, Virus de la Granulose, <i>Bacillus thuringiensis</i> | Soufre, Cuivre, Oxyde cuivreux, Sulfate de cuivre | Sulfate de cuivre | | Oxyde cuivreux | Barrières physiques (filets de protection autour des cultures) |
| Conventionnelle | Huile minérale, Chlorantraniliprole, Deltaméthrine, Cyperméthrine, Chlorpyrifos-éthyl | Mancozèbe, Dodine, Dithianon, Difénoconazole, Captane, Pyraclostrobine, Bupirimate, Fludioxonil | Bore liquide | | | | Barrières physiques (filets de protection autour des cultures), ANA + Benzyladenine (éclaircissage des pommiers) |

2.1.3.2. Les pêches et nectarines

La différence entre les vergers conduits en production raisonnée (ou durable) et ceux conduits en production bio et conventionnelle est l'association de protection chimique et de la lutte culturale. Autrement dit, lorsque cela est possible, les producteurs utilisent des leviers alternatifs à l'utilisation des produits chimiques. On peut donc la considérer comme une agriculture intermédiaire. Concernant le fruit en lui-même, les pêches et les nectarines ont des origines communes : la nectarine est en fait une variété de pêche issue d'une mutation naturelle du pêcher (*Prunus persica*). Ces deux variétés de fruit se distinguent par leurs peaux. En effet, les nectarines ont la peau lisse et brillante alors que les pêches ont une peau duveteuse. De plus, la pêche et la nectarine se distinguent des autres types de « pêche » (brugnon par exemple) par une adhérence moins forte de la chair au noyau.

Les maladies de conservation sont l'un des principaux obstacles à la faisabilité d'une conduite en AB (<http://www.itab.asso.fr/>) tant les moyens pour les maîtriser sont limités. Généralement, 20% des fruits sont pourris en vergers selon les variétés, voire plus pour les variétés tardives. Mais le principal verrou sanitaire de la culture de pêches et de nectarines, et plus généralement des fruits à noyaux, est le développement de *Monilia fructicola* à l'approche de la récolte, et surtout, en post-récolte. L'infection commence pendant la floraison et le pourrissement du fruit peut se produire avant la récolte mais le plus souvent en pos-récolte. L'application de fongicides au champ et le refroidissement rapide après la récolte font partie des stratégies de lutte contre cette infection. Une autre maladie très répandue chez le pêcher est la cloque. Causée par le champignon *Taphrina deformans*, elle peut entraîner des dommages importants aux arbres producteurs de pêches mais aussi de nectarines.

Les maladies bactériennes (la galle du collet, le chancre bactérien...) et les insectes Lépidoptères (papillons et leurs chenilles) font également partis des principales préoccupations dans les vergers de fruits à noyau.

2.1.3.3. Les bananes

La banane est le fruit tropical le plus populaire : le plus produit et le plus consommé dans le monde. Les contraintes parasitaires majeures pour la production de bananes destinées à l'exportation sont la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis*) et la cercosporiose jaune (*M. musicola*) des bananiers. Ces maladies fongiques sont à l'origine de l'apparition de nécroses foliaires et de la maturation précoce des fruits, et entraînent en conséquence une

perte de rendement vu que les fruits sont rendus impropres à l'exportation. L'apparition récente de la cercosporiose noire aux Antilles françaises a induit sur la filière classique un emploi plus important de fongicides.

Aux Antilles, la production de banane vouée à l'export s'appuie sur une seule variété, la Cavendish.

2.1.3.3.1. De Martinique

La parcelle « Cavendish traitées » a subi des traitements antifongiques pour la lutte contre la cercosporiose (utilisation du Propiconazole et du Difénoconazole en solution dans de l'huile de paraffine appliquée par voie aérienne). Un herbicide systémique, dont la molécule active est le Glufosinate, a également été appliqué 2 fois au cours de la croissance des régimes (entre mars et juin 2013) pour toutes les bananes Cavendish et CIRAD 925. Les traitements antifongiques peuvent avoir lieu toutes les 3 à 6 semaines selon les conditions climatiques (vent, humidité, température). Contrairement aux bananes de République Dominicaine, aucun traitement insecticide n'a été appliqué à l'intérieur des gaines qui entouraient les fruits.

En raison de la présence de la cercosporiose sur les bananiers de la variété Cavendish sans traitement, nous avons dû nous contenter de bananes prélevées sur moins de régimes différents comparé aux autres échantillons. De plus, il a fallu récolter les bananes de façon très précoce (au bout d'un mois de croissance) car il en restait très peu de disponibles. C'est pourquoi certains échantillons ont été prélevés plus tôt (voir le **Tableau 2.4.**).

2.1.3.3.2. De République Dominicaine

Quel que soit le système de production, les traitements ont été appliqués sur les parcelles par voie aérienne. Ces traitements étaient pour la grande majorité destinés à lutter contre la cercosporiose noire (**Tableau 2.8.**).

Tableau 2.8. Traitements appliqués sur les bananes de République Dominicaine échantillonnées en 2013 et en 2014 : les molécules actives et leur rôle.

| | Agriculture | Insecticides | Fongicides | Fertilisants | Autres |
|-------------|--------------------|---------------------|---|--|--|
| 2013 | | | Huile de théier, Bicarbonate de potassium | Composts | Barrières physiques (gaines plastique qui protègent les régimes) |
| | Biologique | | | | |
| | | (dans les gaines) | Pyriméthanol, Mancozèbe, Spiroxamine, Carbendazil, Triazole, Époxiconazole, Fenpropimorphe, Thirame | Sulfate de Potassium, Sulfate d'ammonium | Barrières physiques avec insecticides (gaines plastique qui protègent les régimes) |
| 2014 | | | | | Barrières physiques (gaines plastique qui protègent les régimes) |
| | Biologique* | | | | |
| | | (dans les gaines) | Tebuconazole, Mancozèbe, Trifloxystrobine | Sulfate de Potassium, Sulfate d'ammonium | Barrières physiques avec insecticides (gaines plastique qui protègent les régimes) |
| | | | | | |

**Non-renseignés*

2.2. DU FRUIT À SON ÉCOSYSTÈME MICROBIEN

2.2.1. Extractions de l'ADN total

Les ADN ont été directement extraits sur la surface des fruits suivant une méthodologie que nous avons optimisée afin de récupérer autant de matériel que possible²³ : de l'eau peptonée stérile additionnée d'un agent tensioactif non bactéricide, le Tween 80 (1%, v/v) a été ajoutée directement dans chacun des sacs contenant 1 fruit²⁴. Après 30 min de d'incubation à température ambiante sous agitation, le mélange a été transféré dans des tubes Falcon de 50 ml et centrifugé à 3000 g pendant 5 min. Le surnageant est ensuite jeté et le culot remis en suspension avec 3 ml d'eau peptonée stérile (additionnée de 1% de Tween 80). Différentes méthodes d'extraction d'ADN ont ensuite été appliquées. Pour chaque méthode d'extraction un témoin négatif a été réalisé afin de pouvoir vérifier l'absence de contamination dans nos extraits d'ADN génomique.

2.2.1.1. Méthode d'extraction d'ADN par phénol/chloroforme développée en interne

La méthode adaptée de **Ampe *et al.* (1999)**, **Leesing (2005)**, **Le Nguyen *et al.* (2008)** et **El Sheikha *et al.* (2009)** met en œuvre une extraction au phénol/chloroforme. Elle a été appliquée pour l'extraction d'ADN bactériens et fongiques (levures et moisissures). Les différentes étapes sont : 1) une lyse cellulaire et une dénaturation des protéines, suivie d'une étape 2) d'extractions d'ADN au phénol/chloroforme puis 3) d'une précipitation de l'ADN à l'isopropanol.

1) Lyse cellulaire

1 mL de la suspension d'eau peptonnée²⁵ a été prélevé et transvasé dans un tube Eppendorff contenant 0,3 g de billes de verre lavées à l'acide et de diamètre 425-600 µm (Sigma-Aldrich, France). Le mélange a été vortexé vigoureusement pendant 15 min (Vortex Genie 2, États-Unis) puis centrifugé à 12 000 g pendant 15 min. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire a été remis en suspension avec 300 µL de tampon de lyse [2% de Triton X-100 (Prolabo, France), 1% SDS (dodécylsulfate de sodium ; Sigma, France),

²³ Pour les pêches et les nectarines : environ 2 g de peau ont été vortexés séparément à température ambiante pendant 30 min avec 10 mL d'eau peptonée stérile dans des tubes Falcon de 50 mL. Puis 1 mL de la suspension a été prélevé et s'en sont suivies les mêmes étapes d'extraction que pour les autres fruits.

²⁴ Volume adapté pour chaque type de fruit (30 mL pour les pommes par exemple).

²⁵ Deux fois 1 mL lorsque l'on souhaite faire des dupliquas techniques.

100 mM de NaCl [(Sigma), Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0 (Promega, USA)] et 100 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 1 mM; Promega, USA). 100 µL de lysozyme (25 mg/mL, Eurobio, France) et 100 µL de protéinase K (20 mg/mL, Biosolve, Pays-Bas) ont été successivement ajoutés, suivis de 5 min d'incubation à température ambiante. Les échantillons ont été agités manuellement puis incubés à 42°C pendant 20 min. 50 µL de SDS 20% ont été ajoutés dans chacun des tubes qui ont ensuite été incubés à nouveau à 42°C pendant 10 min. 400 µL de CTAB à 2% (Acetyl Trimethyl Ammonium Bromide, Merck, Germany) sont alors ajoutés à chaque tube et ces derniers sont incubés à 65°C pendant 10 min.

2) Extractions d'ADN au phénol/chloroforme

Les lysats ont ensuite été soumis à une double extraction d'ADN au phénol/chloroforme successivement. Pour cela, 700µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v, Carlo Erba, France) ont été ajoutés au lysat puis mélangés manuellement et ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. La phase aqueuse (phase supérieure contenant les acides nucléiques) a été à chaque fois transférée dans un nouveau tube Eppendorff en veillant à ne prélever ni la phase organique (phénolique), ni les protéines précipitées (interface). Le phénol résiduel a été éliminé par addition de 600 µL de chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, Carlo Erba, France) et centrifugé à 12 000 g pendant 10 min.

3) Précipitation de l'ADN

La phase aqueuse a été recueillie et l'ADN a été stabilisé avec de l'acétate de sodium (3 M, pH 5) dont le volume a été ajusté selon le volume final (1/10^{ème} du volume total), suivie d'une précipitation par addition d'un volume égal d'isopropanol. Le mélange est ensuite conservé à -20°C jusqu'au lendemain. Après centrifugation à 12 000 g pendant 30 min, le surnageant a été éliminé, les culots d'ADN ont été lavés avec 500 µL d'éthanol à 70%, et les tubes ont été centrifugés à 12 000 g pendant 5 min. L'éthanol a été ensuite éliminé et les culots ont été séchés à l'air à température ambiante pendant plusieurs heures (jusqu'à évaporation totale de l'éthanol). Enfin, l'ADN a été remis en suspension dans 100 µL d'eau ultra-pure et stocké à -20°C jusqu'à analyse (ou au moins une nuit à 4°C jusqu'à analyse).

2.2.1.2. Utilisation d'un kit d'extraction d'ADN

Le kit FastDNA™ SPIN a été testé sur un lot d'échantillons (bananes de République Dominicaine) dont les ADN avaient également été extraits par la méthode phénol/chloroforme




pour une étude comparative. Ce kit consiste à utiliser des tubes Lysing Matrix A et la procédure GeneClean® basée sur l'utilisation de silice pour purifier l'ADN. En effet, ce kit permet de lyser et d'isoler l'ADN rapidement, à partir de tout type de matrice (sol, fruit, souche pure...) et de tout type d'organisme (plante, algue, bactérie, levure, moisissure...), en utilisant une méthode de filtration sur silice. Les ADN extraits sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à analyse (ou au moins une nuit à 4°C jusqu'à analyse).

Les avantages de ce kit résident dans le fait qu'il permet de réaliser une extraction d'ADN génomique rapide, prêt pour la PCR, reproductible et ne requiert pas l'utilisation de réactifs chimiques dangereux (Mäkinen *et al.*, 2011).

2.2.1.3. Tests de conservation des échantillons avant extraction des ADN

Ces tests ont été réalisés sur les pêches et les nectarines du CTIFL (Bellegarde). Tous les fruits ont été préalablement placés dans des sacs stériles avec 30 mL d'eau peptonée additionnée de Tween 80 (1%, v/v). Le mélange a ensuite été récupéré dans un tube Falcon de 50 mL (1 tube par fruit). Ces tubes ont ensuite été centrifugés afin de concentrer les cellules.

Les culots ont été repris dans 5 mL d'eau peptonée (préalablement additionnée de Tween 80 (1%, v/v)), puis 1 mL du mélange (eau peptonée-Tween80/fruit) a été récupéré et traité selon différentes modalités :

-  **Modalité n°1** : ou protocole « maison » (développé en interne) mettant en œuvre une double extraction d'ADN au phénol/chloroforme.
-  **Modalité n°2** : « eau peptonée + glycérol congelés 50% » à -20°C, cette modalité consiste à congeler les échantillons repris dans l'eau peptonée dans un bain d'azote liquide jusqu'à congélation (30 secondes) pour ensuite stocker les tubes (1 nuit ou 1 mois à -20°) jusqu'à l'extraction d'ADN (phénol/chloroforme).
-  **Modalité n°3** : « eau peptonée + glycérol congelés 50% » à -80°C, mêmes étapes que la modalité n°2 mais avec un stockage à -80°C.

Après décongélation, les extractions ont été réalisées comme décrit dans la **partie 2.2.1.1.**

2.2.2. Contrôle de la pureté et dosage des ADN extraits

La qualité et la pureté des ADN extraits ont été estimés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,8% (p/v) dans du tampon TAE 1X (40 mM de

Tris-HCL, pH 7,4, acétate de sodium 20 mM, 1,0 mM de Na₂-EDTA) et en utilisant un spectrophotomètre (BioSpec-Nano, Shimadzu). 5 µL d'ADN extraits ont été mélangés avec 2 µL de colorant bleu/orange 6X (Promega, USA) puis déposés dans chaque puits du gel d'agarose. Après migration à 100 V dans du tampon TAE 1X pendant environ 45 min, le gel a été immergé 10 min dans une solution de GelRed™ à 0,1 µg/mL (Phenix Produit recherche, dilué dans du TAE 1X). Le gel est visualisé puis photographié sur un transilluminateur UV à 312 nm avec une caméra digitale pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France). La taille des bandes (fragments d'ADN) est estimée en utilisant un marqueur de taille de 1 kb (Promega, USA).

La concentration et la pureté des ADN extraits ont également été estimées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, le BioSpec-nano (Shimadzu, Japon). Cet appareil permet la mesure de l'absorbance d'un échantillon dans une gamme de longueurs d'onde allant de l'UV au visible (200-800 nm) et donne des mesures chiffrées précises d'un échantillon de faible volume (2 µL dans notre cas). L'appareil donne des valeurs d'absorbance à 260 nm ainsi que les ratios des mesures effectuées à A_{260/280} (pour évaluer la pureté des acides nucléiques) et A_{260/230} (pour évaluer la contamination des échantillons d'ADN par des contaminants organiques), permettant ainsi d'estimer le niveau de pureté de l'ADN. Le ratio A_{260/280} rend compte de la teneur en acides nucléiques/protéines et est idéalement compris entre 1,8 et 2 tandis que le ratio A_{260/230} correspond au ratio acides nucléiques/contaminants organiques et doit être compris entre 1,6 et 1,8.

2.2.3. Amplification par PCR et les techniques associées

2.2.3.1. Amplification par PCR en point final

Pour l'analyse de la flore fongique (comprenant les levures et les champignons), un fragment de la région D1/D2 de l'ADNr 26S (appelé aussi 28S dans la littérature) a été amplifié en utilisant des amorces universelles eucaryotes décrites dans le **Tableau 2.9. (Cocolin *et al.*, 2000 ; Kurtzman & Robnett, 1998)**. Pour l'étude de la communauté bactérienne, la région variable V3 de l'ADN 16S a été amplifiée en utilisant des amorces bactériennes universelles décrites également dans le **Tableau 2.9. (Ampe *et al.*, 1999 ; Leasing, 2005 ; Le Nguyen *et al.*, 2008)**.

Tableau 2.9. Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr 16S et 26S en vue d'analyse par DGGE ou séquençage.

| Amorces | Sens/Anti-sens | Position ²⁶ | Séquence (5'-3')* | Tm |
|---------|----------------|------------------------|---|------|
| 338F | Sens | 224108-224127 | ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG | 58°C |
| GC-338F | Sens | 224108-224127 | CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG | 87°C |
| 518R | Anti-sens | 224304-224320 | ATT ACC GCG GCT GCT GG | 55°C |
| NL1F | Sens | 27-51 | GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G | 56°C |
| GC-NL1F | Sens | 27-51 | CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G | 83°C |
| LS2R | Anti-sens | 254-273 | ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC | 50°C |

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant de l'ADN polymérase TopTaq® DNA Polymerase (QIAGEN, France). Le mélange réactionnel est décrit dans le **Tableau 2.10**. L'amplification a été réalisée comme suit (après plusieurs séries d'optimisation en appliquant notamment la PCR en gradient de température²⁷ pour connaître la température d'appariement optimale) : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, puis une série de 35 cycles incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation à 52°C (pour les levures et les champignons) ou 60°C (pour les bactéries) pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 30 sec et enfin, l'élongation finale de 10 min à 72°C.

Tableau 2.10. Composition du mélange réactionnel pour une PCR utilisant l'enzyme TopTaq Polymerase.

| Réactifs | Volume | Concentration finale |
|--|---------|-------------------------|
| 10X TopTaq PCR Buffer (QIAGEN, France) | 5 µL | 1X |
| dNTP (Promega, USA) | 1 µL | 200 µM pour chaque dNTP |
| Amorce 1 (Sigma, France) | 10 µL | 0,2 µM |
| Amorce 2 (Sigma, France) | 10 µL | 0,2 µM |
| TopTaq DNA polymerase (QIAGEN, France) | 0,25 µL | 1,25 unités/réaction |
| ADN | 5 µL | ≤ 1 µg/réaction |
| Eau ultra-pure qsp | 50 µL | |

²⁶ Numérotation établie pour *S. cerevisiae* (numéro d'accèsion GenBank : EU441887.1 pour le 26S) et *E. coli* (MG1655 pour le 16S).

²⁷ Consiste à soumettre les ADN à un gradient croissant de températures d'hybridation.

Après amplification, des aliquotes (5 μ L) des produits PCR, mélangés avec 2 μ L de colorant bleu/orange 6X (Promega, USA), ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (p/v) avec du tampon TAE 1X (40 mM de Tris-HCL, pH 7,4, acétate de sodium 20 mM, 1,0 mM de Na₂-EDTA). Après migration à 100 V pendant environ 45 min, le gel a été immergé 10 min dans une solution de GelRed™ 3X (Phenix Produit recherche, USA, dilué dans du TAE 1X). Le gel a été photographié et la taille des bandes (fragments d'ADN) est estimée en utilisant un marqueur de taille de 100 pb (Promega, USA).

2.2.3.2. L'Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

Les produits PCR (d'environ 190 pb pour les bactéries et 260 pb pour les levures/moisissures) sont analysés par migration sur gel DGGE en utilisant la méthode décrite par **Muyzer *et al.* (1993)** et améliorée par **Le Nguyen *et al.* (2008)** pour les bactéries et **El Sheikha *et al.* (2009, 2011)** pour les levures et les moisissures. L'appareillage DGGE utilisé est le modèle Biorad Dcode (Biorad, USA) (**Figure 2.6.**).

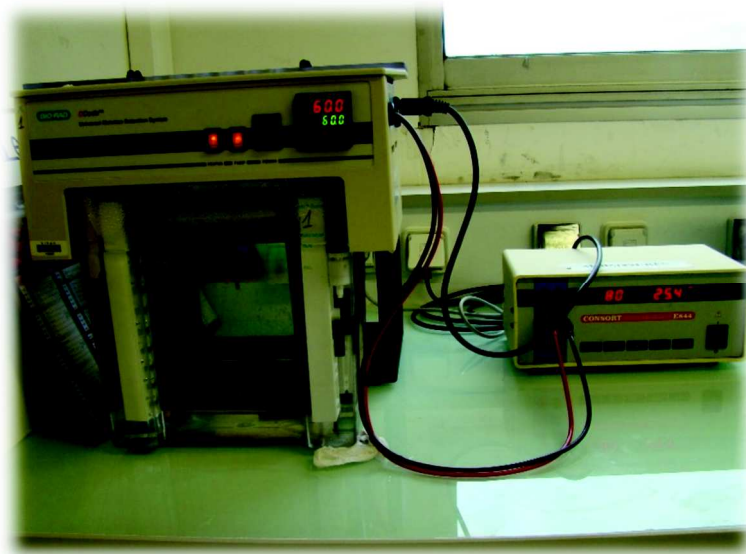


Figure 2.6. Appareil DGGE utilisé, modèle Biorad Dcode (Biorad, USA).

2.2.3.2.1. Caractéristiques du gel de DGGE

L'analyse des fragments amplifiés d'ADNr a été réalisée dans un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1, v/v, Biosolve, France) contenant un gradient de dénaturants chimiques, d'Urée (Eurobio, France) et de Formamide (Thermo Scientific, USA), qui s'étend de 30 à 60% pour l'étude des ADN bactériens (GC-338F/518R, voir **Tableau 2.9.**) et de 35 à 65% pour les ADN fongiques (GC-NL1F/LS2R, voir **Tableau 2.9.**) (sachant que

100% correspond à 7M d'Urée et 40% (v/v) de Formamide). Des essais préalables ont été réalisés fin de nous assurer que les conditions étaient suffisamment dénaturantes pour déstabiliser les 3 liaisons hydrogènes liant les bases G et C et obtenir la meilleure séparation possible des fragments d'ADN amplifiés.

La composition des gels DGGE pour ces différents gradients est donnée dans le **Tableau 2.11**.

Tableau 2.11. Composition des solutions d'agents dénaturants : exemple de préparation d'un gel DGGE ayant un gradient dénaturant allant de 30% à 60%.

| Constituants | Solution A : 60% | Solution B : 30% |
|---|---------------------|---------------------|
| 40% Acrylamide/bisacrylamide (Biosolve, France) | 20 mL | 20 mL |
| Formamide (Thermo Scientific, USA) | 24 mL | 12 mL |
| Urée (Eurobio, France) | 25,2 g | 12,6 g |
| TAE 50X (Euromedex, France) | 2 mL | 2 mL |
| Eau qsp | 100 mL | 100 mL |

Dans deux tubes Falcon 50 mL, les solutions A et B (correspondant aux deux concentrations du gradient dénaturant choisi, respectivement 60% et 30% ou 65% et 35%) sont préparées séparément : dans chacun des tubes A et B, 16 mL de la solution d'agent dénaturant sont mélangés avec 50 μ L de persulfate d'ammonium à 10% p/v en eau distillée (Promega, USA). Les solutions A et B sont ensuite transvasées dans deux compartiments séparés par une vanne (l'un pour le faible gradient, l'autre pour le gradient le plus élevé) d'un préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485, USA) (**Figure 2.7**). Ce dernier étant combiné à une pompe péristaltique (Percom-I, Watson-Marlon, USA) réglée à 30 tours/min. Cela permet de transférer le gel du préparateur de gradient vers le moule contenant deux plaques de verre entre lesquelles on coule le gel (les plaques de verre ont été préalablement nettoyées avec de l'éthanol 100%). Un espace d'environ 0,75 mm sépare les deux verres à l'aide de deux espaceurs placés sur les bords. Une fois que 50 μ L de Trétraméthyléthylenediamine (TEMED) (Promega, USA) ont été ajoutés dans les deux compartiments contenant chaque concentration de dénaturant, le gel est coulé à l'aide d'une seringue et le peigne (permettant la formation de 20 puits) est inséré dans ce gel entre les deux plaques de verre. La durée de polymérisation du gel est d'environ 1h (**Figure 2.7**).

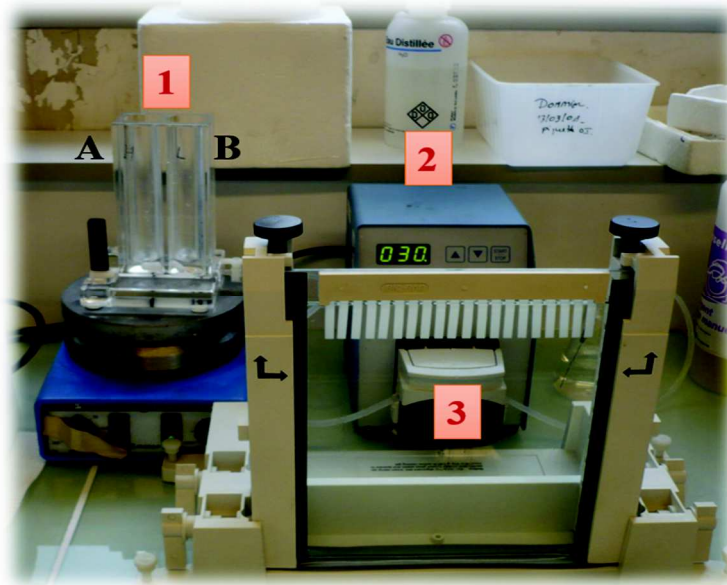


Figure 2.7. Étapes pour la préparation du gel DGGE :

- (1) Compartiment à gradient pour la fabrication du gradient de dénaturation avec une solution à haute concentration en dénaturant (solution A correspondant à 60% pour les ADNr bactériens ou 65% pour les ADNr fongiques) et une solution à faible concentration en dénaturant (solution B correspondant à 30% pour les ADNr bactériens ou 35% pour les ADNr fongiques).
- (2) Pompe péristaltique pour le transfert du gel de 1 vers 3.
- (3) Dispositif comprenant notamment les deux plaques de verre entre lesquelles un gel est en train de polymériser.

2.2.3.2.2. Conditions de migration électrophorétiques

Le temps que le gel soit polymérisé, la cuve d'électrophorèse (Biorad Dcode System, USA) est remplie de tampon TAE 1X (40 mM de Tris-HCL, pH 7,4, acétate de sodium 20 mM, 1,0 mM de Na₂-EDTA) et préchauffée à 65°C. Les produits PCR sont ensuite mélangés avec du tampon de charge (colorant bleu/orange 6X, Promega, USA) dont le volume correspond à 1/6^{ème} du volume de produits PCR à déposer, les quantités ayant été estimées sur gel d'agarose et ajustées pour qu'elles soient équivalentes dans chacun des puits qui composent le gel.

Le gel est ensuite placé dans la cuve et l'électrophorèse est exécutée en deux périodes successives à la température de migration de 60°C (**Díez *et al.*, 2001a**) : 20V pendant 10 min puis 80V pendant 12h pour les ADN bactériens et 14h pour les ADN de levures/moisissures. Après migration, le gel est délicatement retiré des deux plaques de verre et immergé 30 à 45 min dans du GelRed™ 3X (Phenix Produit recherche, USA, dilué dans du TAE 1X) sans rinçage. Le gel est ensuite observé au transilluminateur UV à 312 nm, photographié avec une caméra digitale pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France) et enregistré sous le format TIFF (8-bits, niveaux de gris) en négatif (les bandes d'ADN apparaissent noires sur un fond clair).

2.2.3.2.3. Traitement d'image et analyses statistiques des profils DGGE

Les gels sont ensuite traités à l'aide du logiciel ImageQuant TL version 2007 (Amersham Biosciences, USA). Ce logiciel recouvre automatiquement les bandes d'ADN qui constituent les profils DGGE, avec correction manuelle nécessaire, et génère les fronts de migration (Rf). L'ensemble des bandes ADN qui caractérisent le profil DGGE d'un échantillon (ou d'une colonne du gel) est considéré comme étant une image des espèces (bactériennes ou fongiques) majoritaires présentes dans cet échantillon. Une bande discrète individuelle se réfère à une séquence microbienne unique ou « phylotype » (**Muyzer et al., 1996 ; Kowalchuk et al., 1997 ; Van Hannen et al., 1999 ; Nakatsu et al., 2000**), qui est considérée comme étant un genre ou une espèce de bactérie ou de levure/moisissure. La DGGE permet en effet de séparer les fragments d'ADN qui diffèreraient que par une seule paire de bases (**Casamayor et al., 2000**). Le nombre de bandes ADN correspond à la richesse microbienne et l'intensité de ces bandes ADN à l'abondance relative des espèces microbiennes détectées.

Les profils de bandes ont été normalisés avec deux références incluses dans le gel, qui correspondent à des produits d'amplification d'ADN de souches pures de bactéries (*Escherichia coli* et *Lactobacillus plantarum*) et de levures (*Candida apicola* et *Lodderomyces elongisporus*). Ces témoins rendent compte de la migration dans le gel DGGE et permettent de calibrer le Rf entre différents gels pour une analyse comparative. La différence qui sépare les bandes représentatives des deux ADN témoins est appelée DTe. La position de chaque bande est ensuite mesurée par rapport à la bande de référence située en haut du gel (faible concentration en GC).

Grâce à ces données, le logiciel peut calculer la position relative (PR) des bandes par rapport aux références selon la formule :

$$\text{PR (bande)} = d / \text{DTe}$$

Chaque bande a ainsi pu être caractérisée par sa position relative (**Figure 2.8.**).

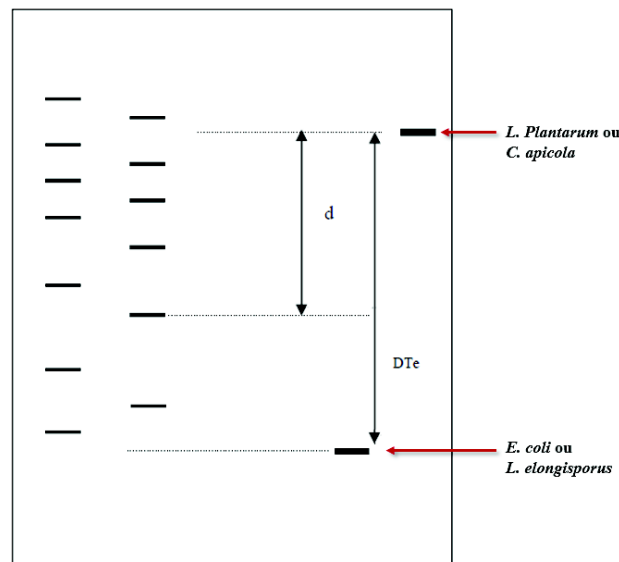


Figure 2.8. Calcul de la position relative (PR) de chaque bande par exploitation d'un gel DGGE.

Les profils DGGE diffèrent par le nombre, la position et l'intensité des bandes obtenues pour chacune des colonnes du gel (une colonne correspondant à un échantillon ou à un produit PCR et, dans notre cas, à la flore bactérienne ou fongique d'un fruit). Ces données ont été exploitées par différents outils statistiques.




➤ **Analyses descriptives**

Les colonnes d'un gel DGGE ont été comparées deux à deux, la présence ou l'absence d'une bande à une position donnée ayant été codée 1 (présence) ou 0 (absence).

Cela nous a permis de calculer le nombre de bandes en commun entre chaque échantillon en appliquant la formule du coefficient de Dice (S_D) (Heyndrickx *et al.*, 1996) :

$$S_D = 2 N_c / N_a + N_b$$

Où :

-  N_a représente le nombre de bandes détectées dans l'échantillon A
-  N_b représente le nombre de bandes détectées dans l'échantillon B
-  N_c représente le nombre de bandes communes aux deux échantillons

L'indice de similarité (ou Dice), également appelé indice de Sorensen, a été exprimé en pourcentage avec une échelle allant de 0 (complètement dissemblables) à 100 (similitude parfaite). Le logiciel « ExcelDiffLane », développé durant ma thèse, permet de générer une matrice binaire correspondant au résultat du calcul du coefficient de similarité pour tous les échantillons d'un même gel DGGE (Schäfer & Muyzer, 2001 ; Fromin *et al.*, 2002). À

partir de cette matrice, l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair-Wise Grouping with Mathematical Averages) est appliqué pour construire un dendrogramme qui illustre la classification des profils. La méthode UPGMA est un algorithme itératif de clustering, c'est à dire de regroupement (ou partitionnement) des données, qui permet la construction d'un arbre phylogénétique en évaluant les distances moyennes entre les bandes prises deux à deux sur un même gel. Cela rend possible une classification numérique des échantillons en utilisant le coefficient de Dice (**Ibekwe *et al.*, 2001**). Ce dendrogramme est généré à l'aide du logiciel le logiciel Primer v.6 (Primer-E Ltd).

➤ **Analyses explicatives**

Il est également possible d'exploiter les résultats des profils DGGE en prenant en compte à la fois l'analyse du nombre de bandes et leur intensité. Ces données ont été exploitées en appliquant la méthode de la PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) ainsi que l'analyse de la diversité microbienne. La PLS-DA est une technique de régression qui est récente mais de plus en plus répandue, en particulier pour les analyses physico-chimiques. Cette méthode statistique généralise et combine les caractéristiques de l'analyse sur composantes principales et de la régression multiple pour maximiser la séparation entre les classes prédéfinies. L'objectif étant de prédire les valeurs d'un groupe de variables Y (variables dépendantes) à partir d'un ensemble de variables X (variables explicatives) (**Tenenhaus *et al.*, 2005**). Dans notre cas, X représente les variables quantitatives qui correspondent au volume de chaque bande d'ADN divisé par le volume total de toutes les bandes d'une même colonne (ou échantillon) d'un gel DGGE (appelé aussi « band percentage ») (donc le volume de la bande ADN rend compte de l'intensité d'une bande ou de l'abondance d'une séquence d'ADN après amplification par PCR). Le volume d'une bande est défini comme étant la surface de cette bande en pixel multipliée par le niveau d'intensité de chaque pixel de la bande (mesuré par le logiciel ImageQuant). Y représente les variables qualitatives, à savoir, dans notre cas, le type d'agriculture (bio ou conventionnelle). L'appartenance à l'une des classes a été prédite par PLS-DA en utilisant le logiciel XLSTAT version 2014. Pour optimiser le nombre de composantes latentes (LV), le pourcentage de classifications correctes (sensibilité et spécificité) obtenus doit être validé à l'aide d'une matrice de confusion. Cette dernière résume l'information concernant les reclassements d'observations et permet d'en déduire les taux de bon et de mauvais classement. Le "pourcentage de classification correcte" correspond au rapport du nombre d'observations bien classées sur le nombre total des observations.

➤ Les indices de diversité

La définition de la biodiversité microbienne fait référence à deux concepts : la richesse (nombre d'espèces) et l'abondance relative des différentes espèces (dominance/équitabilité). La majorité des indices utilisés pour quantifier la diversité d'une communauté prend en compte les deux aspects. La valeur numérique des différents indices dépend principalement de l'importance accordée aux espèces rares et aux espèces abondantes dans le calcul. Des études antérieures ont démontré l'application des indices de diversité en utilisant le nombre total de bandes présentes sur un gel de DGGE et leur intensité relative pour comparer les communautés microbiennes (**Duarte et al., 2012 ; Nikolcheva et al., 2003**). Ainsi, en utilisant les indices de diversité combinés à la description de la structure de la communauté, il est possible d'estimer et de comparer la diversité microbienne d'un échantillon selon le type d'agriculture. Le logiciel gratuit pour l'analyse de données scientifiques Past version 3.06 (**Hammer et al., 2001**) nous a permis d'avoir une estimation de la diversité des communautés microbiennes présentes sur la surface des fruits étudiés.

2.2.3.2.4. *Séquençage des fragments d'ADN*

Les bandes d'intérêt ont été récupérées du gel DGGE par découpe à l'aide d'un scalpel stérile afin de pouvoir séquencer l'ADN et obtenir une identification précise des espèces microbiennes correspondantes. À cette fin, l'ADN doit être purifié selon un protocole que nous avons optimisé : les bandes DGGE ont d'abord été éluées avec 100 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 1 mM; Promega, USA) et conservées à 4°C jusqu'à l'étape de purification (ou au moins une nuit pour permettre l'élution de l'ADN). Le dialysat est récupéré (séparé de la bande de polyacrylamide). Après élution, l'ADN a été stabilisé avec 10 µL d'acétate de sodium (3 M, pH 5). Un vortex a été fait manuellement suivie par une précipitation de l'ADN avec 3 volumes d'éthanol à 100%. Après une incubation à -20°C pendant 30 min, les mélanges sont centrifugés à 12 000g pendant 30 min. Le surnageant a été éliminé et les culots d'ADN ont été lavés avec 500 µL d'éthanol à 70%. Les tubes ont été à nouveau centrifugés à 12 000g pendant 5 min. L'éthanol a été éliminé et les culots ont été séchés à l'air à température ambiante pendant plusieurs heures (jusqu'à évaporation totale de l'éthanol). Enfin, l'ADN a été remis en suspension dans 50 µL d'eau ultra-pure et stocké à 4°C jusqu'à analyse (minimum une nuit, puis stockage à -20°C).

Chaque ADN purifié a été ensuite ré-amplifié par PCR en utilisant les amorces ADN (sans GC-Clamp) et les conditions décrites précédemment. Les quantités d'ADN amplifiés

sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les amplicons PCR sont ensuite envoyés à une société commerciale (GATC Biotech, Allemagne) pour être séquencés par la méthode de Sanger. Les séquences d'ADN obtenues ont été visualisées et éditées avec le logiciel Sequence Scanner v1.0 (Free Applied Biosystems Software). Cette analyse étant réalisée à la fois sur les séquences sens et anti-sens. Après avoir effectué les éventuelles corrections nécessaires sur le chromatogramme, les séquences sens et anti-sens ont été alignées avec le logiciel MEGA (version 6.06) afin d'identifier les régions communes et former la séquence « complète ». Celle-ci a ensuite été comparée aux bases de données pour identification. L'algorithme BLAST permet de rechercher dans les bases de données publiques (GenBank sur le site de NCBI) les séquences connues qui sont les plus proches des nôtres. Pour cela, BLAST aligne nos séquences contre l'ensemble des séquences de la base de données. Les paramètres fournis par le logiciel comme le score, la E-value, le pourcentage d'identité etc... ont été étudiés afin de réaliser les identifications avec la plus grande probabilité statistique.

2.2.3.3. Amplification par PCR quantitative en temps réel

Les essais de qPCR ont été réalisés dans un premier temps pour vérifier si les profils DGGE obtenus étaient reliés à la charge microbienne retrouvée à la surface des fruits. Pour cela les mêmes amorces ADN que celles des analyses par DGGE ont été utilisées (voir **Tableau 2.9.**), mais sans le GC-Clamp. Les analyses ont été effectuées avec l'équipement LightCycler 480 I (480 LC Roche, USA) et dans des plaques contenant 384 puits de la platemeforme PCRHQ de l'Université de Montpellier. Le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume final de 6 μ L avec une polymérase « *hot start* », 2 μ L d'ADN et en présence de l'intercalant fluorescent SybrGreen. Ce dernier s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice d'ADN et fluoresce lorsque l'ADN est sous-forme double brins (à l'état libre il ne fluoresce quasiment pas). Les échantillons ont été analysés en triplicats à plusieurs dilutions différentes. La qPCR était considérée comme étant efficace si le cycle seuil (ou Ct) était inférieur à 30. La valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

L'optimisation de la PCR en temps réel a été réalisée à partir d'ADN synthétiques (Cf **Annexe 1**) qui ont été utilisés comme de standards pour la construction de la gamme

étalon. Ces séquences ADN, correspondant aux portions d'ADNr 16S (197 pb) et 26S (247 pb) où s'hybrident respectivement les amorces 338F/518R et NL1F/LS2R (**Tableau 2.9.**), ont été synthétisés chimiquement (Genecust, Luxembourg) et clonés dans le plasmide pUC57 (2710 pb).

Diverses concentrations d'amorces et températures d'hybridation ont été testées afin d'obtenir la plus forte affinité des amorces avec les ADN cibles, et être ainsi dans les conditions les plus optimales possibles pour l'amplification. Les conditions d'amplification retenues suite aux différents tests d'optimisation sont les suivantes : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 5 minutes suivie d'une série de 45 cycles constituée par une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 s, suivie de l'hybridation des amorces à 60°C (ADN fongiques et ADN bactériens) pendant 10 s et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 10 s suivie par l'étape de HRM. Les concentrations des amorces étaient de 0,8 µM pour les bactéries et les levures/moisissures.

Étant donné qu'en qPCR on se base sur le fait qu'à chaque cycle on double la quantité de la séquence cible et que pendant la phase exponentielle la quantité d'ADN cible à un cycle donné est proportionnelle à la quantité initiale de la cible, on peut donc considérer qu'une différence d'un Ct entre 2 échantillons correspond à une différence d'un facteur 2 en quantité d'ADN cible. Mais dans la réalité l'amplification dépend d'une efficacité d'amplification E, qui correspond à la proportion moyenne de molécules produites à chaque cycle (E étant idéalement égale à 2). Les efficacités PCR des échantillons standards et des échantillons inconnus doivent être les mêmes.

La conversion « pente de courbe standard » en « efficacité PCR » est donnée par la relation suivante :

$$X_T = X_0 * (1 + E)^{Ct}$$

Où : X_T = quantité d'ADN au cycle seuil ; X_0 = quantité d'ADN au cycle 0 ; E = efficacité d'amplification ; Ct = cycle seuil

Cette équation peut se linéariser en : $\log X_T = \log X_0 + Ct \log(E)$. En réarrangeant l'équation sous la forme $y = ax+b$, on obtient l'équation de la courbe d'étalon (y étant représenté par Ct et x par $\log X_0$): $Ct = -(1/\log E) \log X_0 + (\log X_T / \log E)$. La pente de la droite étant $-(1/\log E)$ et l'ordonné à l'origine $(\log X_T / \log E)$.

En qPCR, il est possible de réaliser une quantification relative ou une quantification absolue. La différence entre les deux réside dans l'utilisation d'un standard ou non. Pour une quantification relative ce dernier n'est pas nécessaire et on comparera alors la quantité de matrice dans deux conditions dont l'une sert de référence, et en considérant que l'efficacité est égale à 2. Dans l'autre cas, le nombre de copies initialement présentes dans l'échantillon de référence est connu et permet alors de déduire le nombre de copies dans l'échantillon étudié (**Figure 2.9.**). Pour notre étude, des quantifications absolues ont été réalisées.

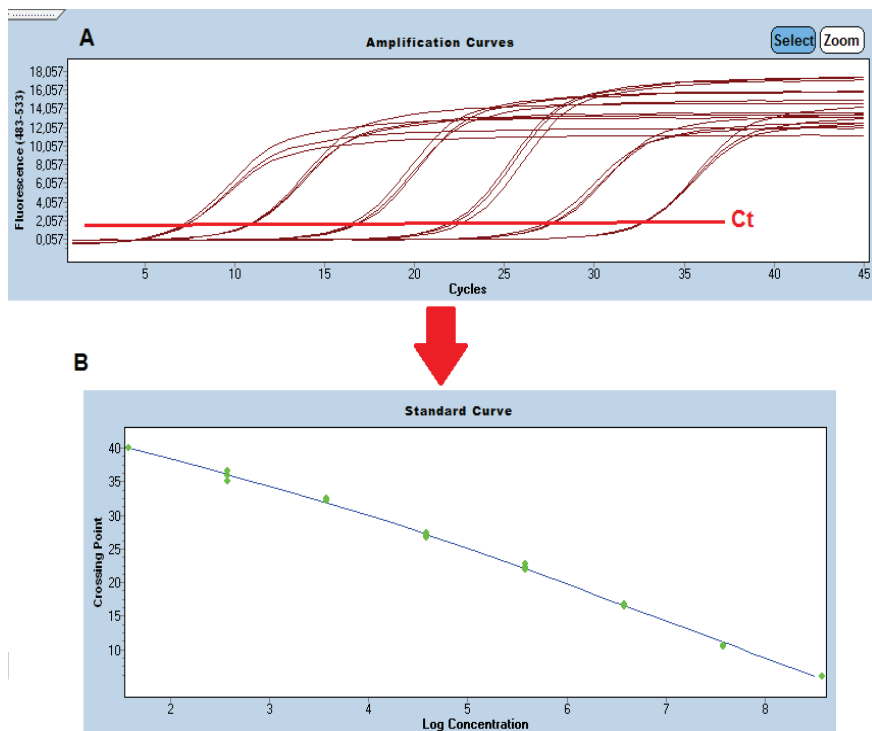


Figure 2.9. (A) Courbe d'amplification où la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles, (B) Courbe d'étalon.

La spécificité de cette chimie dépend directement de la spécificité des amorces employées (**Bustin, 2000**). De plus, cette technologie peut présenter une certaine versatilité du fait que le SYBR Green I puisse se fixer à n'importe quelle molécule d'ADN double brin. La spécificité de l'amplification au cours de la qPCR est vérifiée par l'utilisation d'un témoin négatif, où l'ADN est remplacé par de l'eau. Cela permet de vérifier l'absence de dimères d'amorces, et de contaminants. Il est également réalisé à la fin de l'étape d'amplification une cinétique de fusion. Cela permet de distinguer le pic de fusion d'un produit PCR des pics de fusion de produits non-spécifiques qui vont « fondre » à des températures plus faibles et présenteront des pics plus larges.

2.2.3.4. Analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM)

Le principe de la HRM repose sur la capacité de l'ADN double brin à se dénaturer dans des conditions de température élevée. Cette dénaturation entraîne la libération du fluorochrome et donc la diminution de la fluorescence jusqu'à son extinction totale lorsque la dénaturation sera complète. La courbe de fusion est obtenue en représentant la fluorescence en fonction de la température. Cette courbe de fusion sera dépendante de la séquence ADN, de sa taille et de sa composition en G et C. Ainsi, chaque séquence d'ADN particulière aura une signature lumineuse qui lui sera propre.

Les essais de HRM ont été réalisés directement après la qPCR sur une gamme de température allant de 40°C à 95°C par paliers de 0,02°C/sec. L'intérêt d'utiliser cet outil était d'avoir une image globale des populations microbiennes d'un échantillon donné pour détecter une signature moléculaire des groupes ou populations microbiennes qui seraient spécifiques à un mode de production. Les données de qPCR/HRM ont été analysées avec le logiciel LightCycler® 480 version 1.5.0 SP4.

2.2.3.5. Séquençage à haut débit : la méthode Illumina

La technologie de séquençage Illumina s'appuie sur une « amplification par pontage » (appelée aussi « bridge PCR ») des fragments à séquencer suivie d'un séquençage par synthèse chimique (SBS). Pour cela, des séquences adaptatrices (ou adaptateurs/ligands) sont associées aux extrémités des fragments d'ADN simples brins. Ces fragments d'ADN sont ensuite immobilisés (de façon aléatoire) sur une surface en verre (ou « flow cell », FC) sur laquelle se trouvent des amorces (dont les séquences adaptatrices sont complémentaires). Les adaptateurs vont alors permettre aux fragments d'ADN (amplicons PCR) de se fixer sur la FC par hybridation avec les amorces qui la recouvrent (**Figure 2.10.**). Le brin complémentaire au fragment d'ADN va alors pouvoir être synthétisé. L'amplification par pontage va permettre l'amplification localisée d'un fragment unique en plusieurs centaines de millions de fragments identiques (amplification clonale) formant un regroupement d'ADN clonal appelé « cluster ». Les brins anti-sens sont ensuite clivés à la fin des amplifications pour permettre la linéarisation des brins sens et leur séquençage.

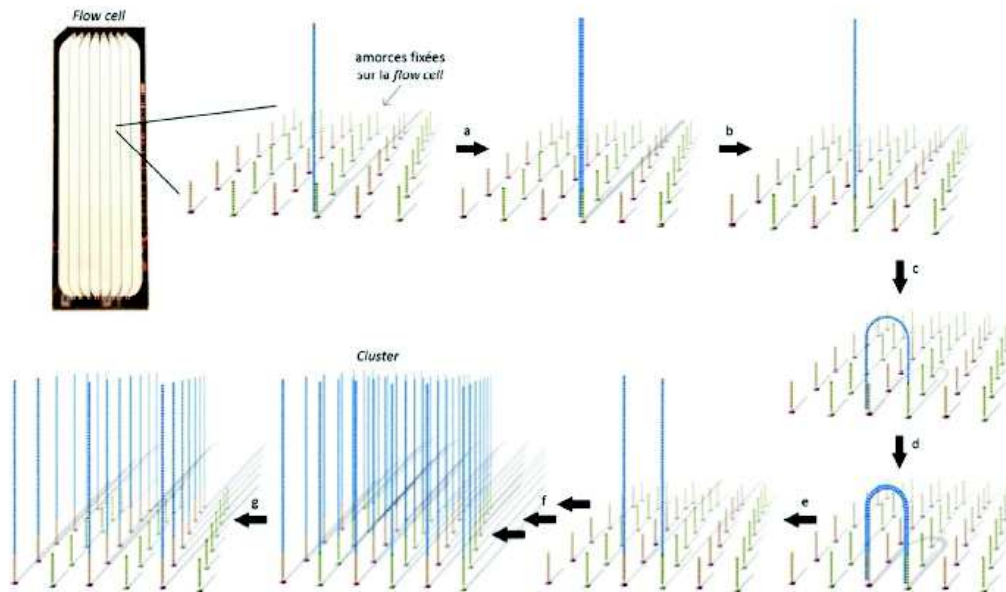


Figure 2.10. Principe de l'approche Illumina (Sengenès, 2012).

a) Après fixation du fragment d'ADN sur le support en verre, le brin complémentaire est synthétisé, **b)** s'ensuit une étape de dénaturation où le brin d'origine est éliminé puis **c), d)** la polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire par pontage. **e)** Dénaturation des ADN double brin entraînant la formation de deux brins d'ADN rattachés à la surface solide par les adaptateurs. **f)** Amplification clonale et **g)** Linéarisation.

Le séquençage s'effectue de façon simultanée sur les différents clusters (des centaines de millions) à l'aide de nucléotides dont l'extrémité 3'OH est désactivée et marquée par des fluorochromes spécifiques à chaque nucléotide. Ces nucléotides sont incorporés les uns après les autres. Les fluorochromes sont excités grâce à des lasers permettant l'émission d'un signal lumineux détecté par une caméra. Ces signaux seront alors traduits en séquences nucléotidiques à l'aide de logiciels.

Cette méthode a été appliquée dans le cadre de ma thèse afin de mettre en évidence des taxons qui seraient spécifiques aux fruits issus de l'AB. Pour cela, après avoir amplifié l'ADN avec les amorces F343/R784, ciblant la région V3-V4 de l'ADNr 16S (**Tableau 2.12.**), les amplicons (environ 460 pb) ont été envoyés à la plateforme GeT-PLaGe de l'équipe NED (Nutrition et Ecosystèmes Digestifs) à l'INRA de Toulouse. Les amplifications ont été réalisées selon les conditions décrites dans la **partie 2.2.3.1**. La température d'hybridation optimale a été recherchée en effectuant des PCR en gradient de température.

Tableau 2.12. Amorces utilisées pour le séquençage Illumina.

| Amorces | Sens/Anti-sens | Position ²⁸ | Séquence (5'-3') | Tm |
|---------|----------------|------------------------|---------------------------------|------|
| F343 | Sens | 224112-224154 | CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG | 70°C |
| | | | ATC TAC GGR AGG CAG CAG | |
| R784 | Antisens | 224554-224601 | GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG | 70°C |
| | | | ATC TTA CCA GGG TAT CTA ATC CT | |

La technologie de séquençage MiSeq permet la réalisation du séquençage paire-end de 2 x 250 bases. Étant donné que les extrémités de chacune de ces séquences se chevauchent et peuvent être accolées pour former de très longues séquences de haute qualité, celles-ci couvrent la totalité des régions V3 et V4 en un seul séquençage. Toutes les séquences paire-end ont été assignées à leur propre échantillon à l'aide des adaptateurs précédemment intégrés. Ces séquences ont ensuite été purifiées et chargées dans la cartouche du système de séquençage Illumina MiSeq. La qualité du séquençage a été vérifiée à l'aide de PhiX Control Library v3 et des échantillons standards d'ADN bactériens et fongiques, puis toutes les séquences paire-end ont été assignées à leur propre échantillon à l'aide de l'index précédemment intégré. Les données sont ensuite traitées de la façon suivante (**Jaquier et al., 2014**) : nettoyage des séquences et détection des chimères en utilisant l'algorithme Uchime (**Schloss et al., 2009**). Puis, clusterisation par l'outil Esprit-Tree. Cette étape permet de regrouper les séquences en Unité Opérationnelle Taxonomique (OTU), avec l'idée qu'un OTU correspondrait à une espèce bactérienne ou fongique. Ce regroupement en OTU se fait grâce au logiciel SWARM (**Mahé et al., 2014**). Enfin, l'affiliation phylogénétique est réalisée par alignement entre OTUs et la banque de données Silva119²⁹ (**Pruesse et al., 2009**).

Ainsi, la combinaison de ces différents outils de biologie moléculaire décrits dans cette partie nous a permis d'avoir une vision systémique de la flore microbienne présente à la surface des différents fruits étudiés.

²⁸ Numérotation établie pour *Serpula himantiodes* (AM946630, pour la région ITS) et *E. coli* (MG1655 pour le 16S).

²⁹ Permet d'avoir accès aux séquences des gènes d'ARNr 16S et 23S de *Bacteria* et d'*Archaea* mais également des gènes ribosomiaux eucaryotes.

3. Résultats et discussion

-
-
-



3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 COMPARAISON DES PROTOCOLES ET DES MODALITÉS D'EXTRACTION DES ADN GÉNOMIQUES

L'intégrité des ADN totaux est la clé de voûte des investigations fondées sur le génome microbien. Différents protocoles ont été développés pour l'isolement de l'ADN génomique de microorganismes, dont la plupart ont été revendiqués pour être reproductibles avec des rendements relativement bons d'ADN de haute qualité. Néanmoins, certains protocoles font preuve d'une efficacité relative pour l'extraction globale d'ADN microbiens en raison des caractéristiques physiques et chimiques des échantillons (**Gill *et al.*, 2006b**).

De plus, durant ces travaux de thèse nous nous sommes heurtés à la difficulté de pouvoir réaliser les extractions d'ADN génomiques directement après réception des fruits. Cette difficulté était d'autant plus grande que les fruits sont des denrées très périssables. Il fallait donc procéder rapidement aux extractions des ADN génomiques, ou du moins à la préparation des échantillons pour une conservation optimale (**cf. partie 2.2.1.**).


Ce premier chapitre sera tout d'abord consacré aux résultats obtenus pour les tests de conservation des extraits réalisés à partir de pêches et de nectarines. Seront ensuite présentés les résultats obtenus pour la comparaison de deux méthodes d'extraction appliquées sur des échantillons de bananes.

3.1.1. Est-il possible de conserver les échantillons avant les étapes d'extraction ?

Trois modalités de conservation des échantillons ont été testées en vue de réaliser ultérieurement les étapes d'extraction d'ADN génomiques dans le cas où elles ne pouvaient être réalisées dans l'immédiat, et surtout pour établir une procédure à appliquer sur tous les échantillons pour avoir des résultats homogènes.

Ces essais ont été réalisés sur des pêches et des nectarines récoltées au CTIFL de Bellegarde, avec 5 pêches et 5 nectarines par modalité afin de tester la variation inter-fruits.

Les différentes modalités testées étaient les suivantes :

-  **Modalité n°1** : ou protocole « maison » (développé en interne) mettant en œuvre une extraction d'ADN au phénol/chloroforme.

📌 **Modalité n°2** : « eau peptonée + glycérol congelés 50% » à -20°C, cette modalité consiste à congeler les échantillons repris dans l'eau peptonée dans un bain d'azote liquide jusqu'à congélation (30 secondes) pour ensuite stocker les tubes (1 nuit ou 1 mois à -20°) jusqu'à l'extraction d'ADN (phénol/chloroforme).

📌 **Modalité n°3** : « eau peptonée + glycérol congelés 50% » à -80°C, mêmes étapes que la modalité n°2 mais avec un stockage à -80°C.

Pour les modalités 2 et 3, après décongélation des échantillons, les extractions de l'ADN génomique ont été réalisées selon la modalité n°1.

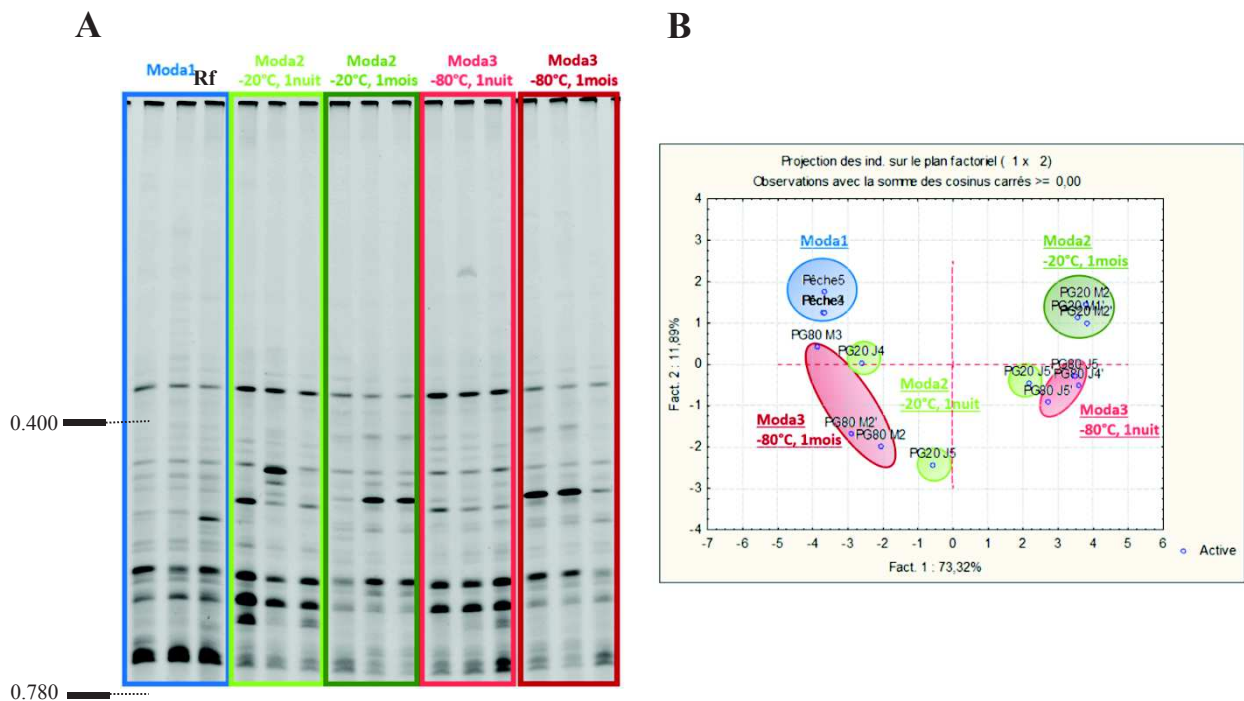


Figure 3.1. Profils DGGE des ADNr bactériens (A) extraits et amplifiés par PCR à partir de pêches échantillonnées en 2014 au CTIFL avec les analyses ACP correspondantes (B).

**Moda* = Modalité

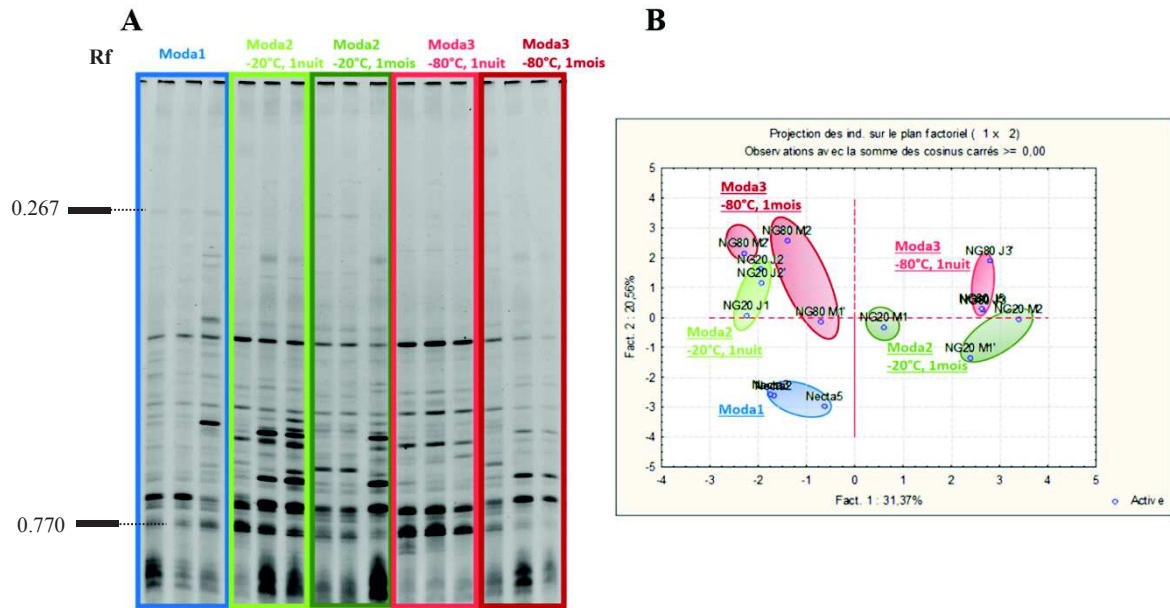


Figure 3.2. Profils DGGE des ADNr bactériens (A) extraits et amplifiés par PCR à partir de nectarines échantillonnées en 2014 au CTIFL avec les analyses ACP correspondantes (B).

*Moda = Modalité

La flore fongique (levures et moisissures) n'a pas pu être étudiée. On suppose que les ADN génomiques extraits étaient en quantité trop faible car, après amplification par PCR, l'intensité des bandes ADN obtenues était trop faible et les quantités d'amplicons n'étaient donc pas suffisantes pour réaliser des analyses par DGGE.

Les résultats présentés ici sont ceux qui ont été obtenus pour l'analyse comparative des profils DGGE bactériens en fonction des modalités d'extraction. Ces résultats sont illustrés dans les **Figures 3.1.A** et **3.2.A** et montrent qu'il existe une variation inter-fruits : certaines bandes sont présentes dans un profil mais absentes dans un autre, ou ont des intensités différentes, alors que ce sont des profils bactériens de plusieurs fruits d'une même modalité. Cependant, les analyses ACP démontrent que cette variation n'est pas significative puisque les différentes modalités sont distinguables les unes des autres (**Figures 3.1.B** et **3.2.B**). Sauf dans le cas des échantillons de pêches de la modalité 2 « -20°C 1 nuit » qui présentent de très fortes variations et ne peuvent être regroupés entre eux (**Figure 3.1B**). Ces échantillons ne seront donc pas inclus dans les interprétations qui vont suivre.

La représentation graphique des variables sur les deux premières composantes de l'ACP (**Figures 3.1.B** et **3.2.B**) démontre que les échantillons de la modalité 1 et de la modalité 3 (conditions -80°C, 1 mois) ont tendance à se regrouper entre eux. Et ce, quel que

soit le type de fruit étudié (pêche/nectarine). En effet, les échantillons de ces modalités sont séparés des autres (modalité 3, conditions -80°C/1 nuit, et modalité 2, conditions -80°C/1 mois) principalement par le premier axe (« Fact. 1 »). Le niveau de similarité entre les échantillons de la modalité 1 et de la modalité 3 (conditions -80°C, 1 mois) est plus élevé par rapport aux autres échantillons. Cette observation est plus claire dans le cas des pêches car l'axe principal représente 70% de l'information (**Figure 3.1.B**) contre 30% dans le cas des nectarines (**Figure 3.2.B**).

Ainsi, les résultats obtenus pour l'analyse comparative de la flore bactérienne en fonction des modalités d'extraction montrent qu'il est possible de conserver les échantillons à -80°C jusqu'aux étapes d'extraction.

3.1.2. Comparaison des protocoles d'extraction d'ADN génomiques (microbiens) à partir de fruits

Certaines études ont démontré que les extractions d'ADN des microorganismes d'un même échantillon, prélevé dans un environnement donné, ne peuvent pas représenter de manière efficace la flore microbienne globale selon le type de dégradation des parois cellulaires choisi : lyse chimique, lyse mécanique etc... (**Gill et al., 2006b**). Il a également été démontré que la mesure de la diversité des communautés microbiennes pouvait varier en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN utilisée (**Luna et al., 2009 ; Martin-Laurent et al., 2001 ; Stach et al., 2001 ; Tang et al., 2008**). Nous avons donc choisi comparer deux méthodes d'extraction afin d'estimer les variations sur les codes-barres génétiques obtenus par DGGE : la méthode utilisant le phénol/chloroforme et le kit d'extraction FastDNA™SPIN. Les avantages de ce kit résident notamment dans le fait qu'il permet de réaliser une extraction d'ADN génomique rapide à partir d'un large choix de matrices et qu'il ne requiert pas l'utilisation de réactifs chimiques dangereux (**Mäkinen et al., 2011**). D'où l'intérêt de le tester avant de le mettre en place au sein du laboratoire de notre équipe.

Les profils DGGE obtenus sur les extraits d'ADN, issus du protocole phénol/chloroforme et du kit FastDNA™ SPIN, ont été comparés. Pour cela, les deux méthodes d'extractions ont été réalisées sur un même lot d'échantillon. Les essais ont été réalisés à partir de 5 bananes bio et 5 bananes conventionnelles de République Dominicaine échantillonnées en juin 2014. L'ADN a été extrait par les deux méthodes, puis les ADN génomiques fongiques et bactériens ont été amplifiés par PCR. À noter que les réactifs

présents dans le kit étant différents selon le type de microorganisme dont on souhaitait extraire l'ADN, les extractions ont dû être réalisées séparément (contrairement à la méthode d'extraction d'ADN au phénol/chloroforme où l'ADN total est extrait dans le même tube). Les ADN ont été directement extraits sur la surface des fruits selon la méthodologie décrite dans la partie « Matériels et méthodes », et qui a été appliquée pour tous les fruits de l'étude. La pureté et le dosage des ADN extraits ont ensuite été estimés sur gel d'agarose à 0,8% (**Figure 3.3.**) et à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, le BioSpec-nano (Shimadzu, Japon).

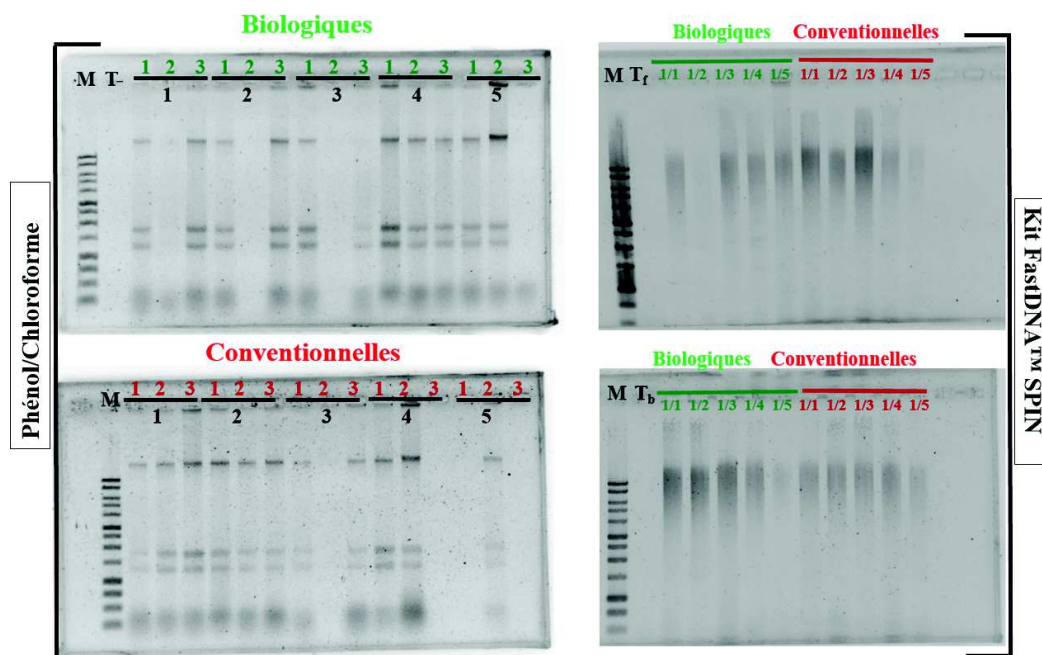


Figure 3.3. Vérification des ADN génomiques extraits par la méthode phénol/chloroforme (gauche) et le kit FastDNA™ SPIN (droite)

*M = Marqueur de taille de 1 kb

Des bananes **bio** et **Conventionnelles** ont été prélevées en 2014 sur 5 régimes (notés de 1 à 5 sur les gels de gauche) à 3 niveaux différents : la partie supérieure (**1** pour bio ou **1** pour conventionnelle), au centre (**2** pour bio ou **2** pour conventionnelle) et la partie inférieure du régime (**3** pour bio ou **3** pour conventionnelle). Avec un fruit par partie du régime.

Les ADN génomiques extraits montrent plusieurs bandes majoritaires dont une avec un poids moléculaire supérieur à 16 kb nettement visibles après extraction au phénol/chloroforme. Les extraits d'ADN issus du kit montrent plutôt un smear de haut poids moléculaire. Cela peut être dû à certains réactifs spécifiques au kit dont les compositions ne sont pas précisées. Le dosage des ADN génomiques extraits indique que des quantités voisines de 40 ng / μ L sont obtenus pour les extraits « bactériens » et 50 ng/ μ L pour les extraits « fongiques » en utilisant le kit d'extraction, et en moyenne 40 ng/ μ L en utilisant la méthode d'extraction au phénol/chloroforme. Le ratio $A_{260/280}$ rends compte de la teneur en

acides nucléiques/protéines et est idéalement compris entre 1,8 et 2, ce qui est le cas pour l'ensemble des ADN extraits avec les deux méthodes d'extraction. De même, le ratio $A_{260/230}$ correspond au ratio acides nucléiques/contaminants organiques et doit être compris entre 1,6 et 1,8. Pour les ADN extraits au phénol/chloroforme, les résultats vont généralement dans ce sens, à l'inverse, les ADN extraits avec le kit ont un ratio $A_{260/230}$ très faible (en dessous de -1). Ce qui suggère que les ADN extraits par le protocole utilisant le phénol/chloroforme sont plus purs que ceux extraits avec le kit. Ce faible ratio peut s'expliquer par la présence de molécules dans le kit qui absorbent vers 230 nm, ou un rendement d'extraction plus faible qui laisserait l'ADN lié à des contaminants, comme par exemple des substances humiques (qui se formeraient à la suite de la décomposition des microorganismes), ou autres inhibiteurs de PCR. Ceci peut être surmonté en diluant les ADN extraits.

Les amplifications par PCR ont par la suite été réalisées avec les mêmes amorces ADN et les mêmes conditions que celles décrites dans la **partie 2.2.3**. Les fragments d'ADN amplifiés ont ensuite été analysés par DGGE. Pour les deux méthodes, les quantités d'ADN fongiques amplifiées étaient trop faibles pour pouvoir les étudier par DGGE.

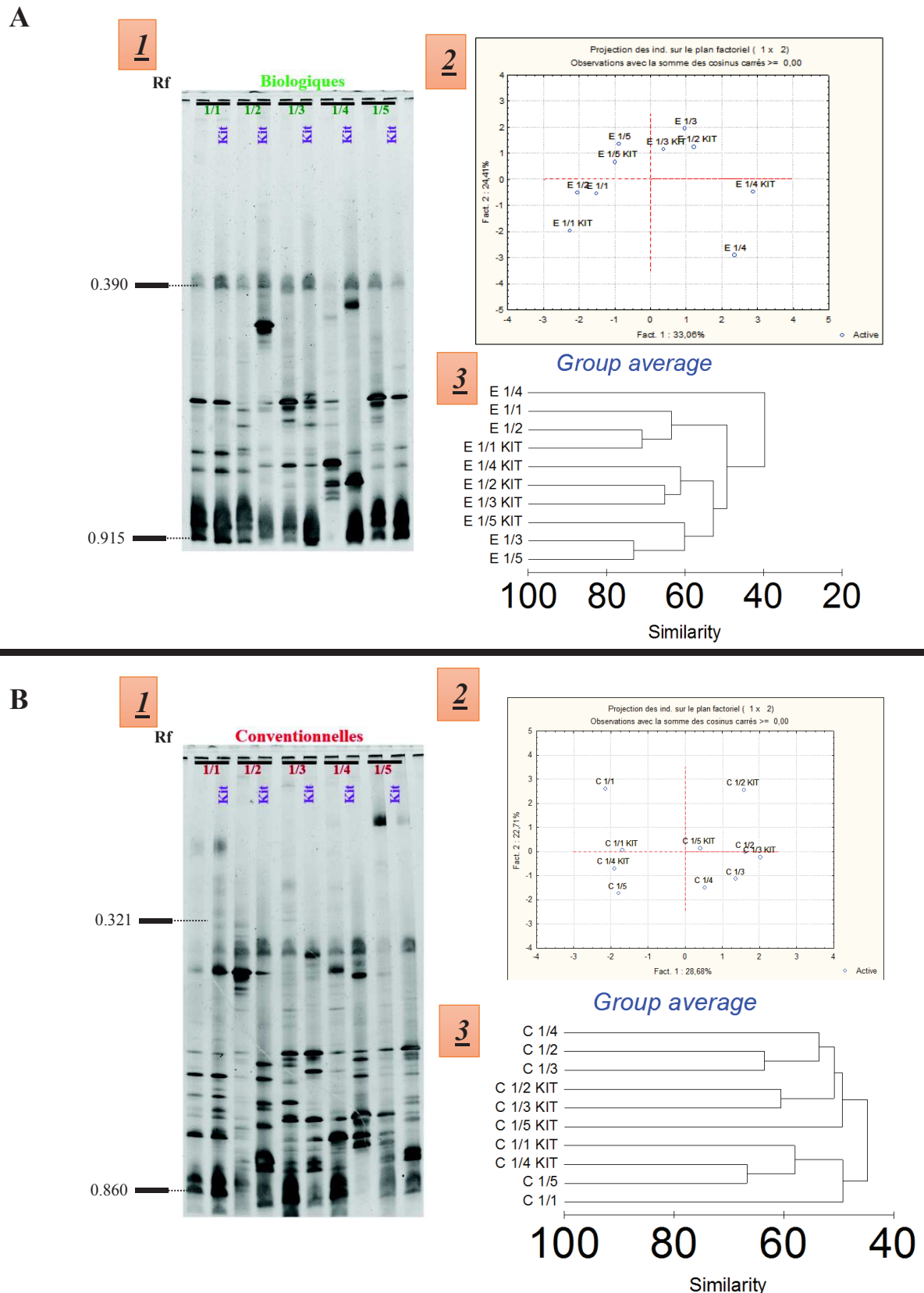


Figure 3.4. Profils DGGE des ADNr bactériens extraits à partir de bananes biologiques (A 1) et conventionnelles (B 1) échantillonnées en 2014 en République Dominicaine avec les analyses ACP (2) et de clustering (3) correspondantes.

L'analyse par DGGE des communautés bactériennes associées aux différents types de bananes a montré un impact significatif des différentes méthodes d'extraction (**Figures 3.4.**). En effet, visuellement, selon la méthode appliquée, les bandes ADN peuvent varier en intensité ou même devenir non détectable selon la méthode d'extraction utilisée. Cependant, la moyenne du nombre de bandes d'ADN bactérien associée aux bananes étudiées est similaire entre les deux méthodes d'extraction comparées (**Tableau 3.1.**). Le test de Student nous a permis de vérifier la significativité de ces résultats. Cela nous indique que la méthode d'extraction a une efficacité (rendement) différente selon les espèces bactériennes, selon leurs parois cellulaires ou selon leurs formes de vie (végétatives ou spores). Ce constat s'accorde avec la littérature scientifique (**Luna et al., 2009 ; Martin-Laurent et al., 2001 ; Stach et al., 2001 ; Tang et al., 2008**). Ces études ont démontré que la mesure de la diversité des communautés microbiennes pouvait varier en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN utilisée. Ceci est donc à considérer pour l'analyse d'échantillons complexes et, notamment, dans le cas de dosages quantitatifs (abondance) les bactéries ne réagissent pas de manière égale du fait que les parois microbiennes varient selon les espèces (que ce soit pour les procaryotes ou pour les eucaryotes). Il faut également prendre en compte les biais liés à l'amplification par PCR. Cette amplification va en effet privilégier les séquences ADN majoritaires et les séquences ADN plus facilement amplifiables dans une communauté microbienne complexe (**Casamayor et al., 2000**). Le nombre de copies d'ADNr 16S, la formation de chimères ou d'hétéroduplex peuvent également engendrer des biais dans l'interprétation des résultats.

Tableau 3.1. Nombre de bandes/espèces bactériennes retrouvées sur les bananes étudiées en fonction du protocole d'extraction d'ADN utilisé.

| | Phénol/Chloroforme | | Kit FastDNA™ SPIN | |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|
| | <i>Biologiques</i> | <i>Conventionnelles</i> | <i>Biologiques</i> | <i>Conventionnelles</i> |
| Nombre de bandes (moyenne) | 20 | 29 | 19 | 25 |

Les résultats obtenus après les analyses statistiques (**Figure 3.4.**) concordent avec ce qui a été précédemment décrit : la composition des communautés microbiennes peut varier en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN. En effet, bien que le pourcentage de variabilité, représenté sur les deux premiers axes de l'ACP (**Figures 3.4.A2 et 3.4.B2**), ne soit pas élevé (autour de 50%), on peut observer un regroupement étroit entre les « répétitions biologiques » issues d'un même protocole. Ce terme de « répétitions biologiques » sous-

entend que la même mesure (avec utilisation du kit ou du phénol/chloroforme pour les extractions d'ADN) a été réalisée sur plusieurs bananes différentes. Dans le cas de la répétition technique, la mesure est réalisée plusieurs fois sur le même échantillon (ou la même banane). Les essais ont été réalisés sur uniquement des répétitions biologiques. Les répétitions biologiques ont été considérées plus importantes que les répétitions techniques pour des questions pratiques (nombre de puits limité dans un gel DGGE par exemple), de temps et de budget. Il est en effet possible de faire des répétitions techniques en plus des répétitions biologiques, mais les coûts financiers engendrés limitent cette possibilité. Mais aussi parce que l'on considère que les méthodes utilisées sont plus fiables et reproductibles que la variabilité biologique. Pour ces raisons, il nous a paru plus judicieux de prioriser les répétitions biologiques pour l'ensemble des analyses réalisées durant ces travaux de thèse.

Les analyses de clustering démontrent que, globalement, les bananes issues d'un même mode de production se regroupent entre elles avec seulement 40% de similarité (**Figures 3.4.A3 et 3.4.B3**). De plus, les échantillons dont les ADN avaient été extraits par les deux méthodes ne se regroupent pas entre eux ou présentent des pourcentages de similarité variables (de 40 à 65% environ). Par exemple, les échantillons E1/4 (ADN extraits avec le phénol/chloroforme) et E1/4 KIT (même banane mais l'ADN avait été extraits avec le kit) ont une similarité de 40% alors que les échantillons E1/1 et E1/1KIT sont regroupés dans un même cluster avec 60% de similarité (**Figure 3.4.A3**). Les méthodes d'extraction d'ADN appliquées ne ciblent donc pas les mêmes espèces bactériennes.

3.1.3. Conclusion

En définitive, les essais réalisés ont démontré qu'il était possible de conserver les échantillons à -80°C dans du glycérol avant de réaliser l'étape d'extraction des ADN sans altérer significativement les résultats obtenus.

Il a également été constaté que les méthodes d'extraction appliquées ne couvraient pas la communauté bactérienne d'un échantillon avec la même efficacité. En effet, les profils DGGE des communautés bactériennes à partir d'un même échantillon varient en fonction de la méthode d'extraction utilisée. Cela a été démontré lors de précédentes études, en particulier à partir d'échantillons de sols (**Martin-Laurent et al., 2001 ; Stach et al., 2001 ; Tang et al., 2008 ; Luna et al., 2009**). **Lipthay et al. (2004)** ont d'ailleurs testé différentes procédures d'extraction d'ADN et évalué leur impact sur la composition de communautés bactériennes

issues de sols variés par PCR-DGGE. Ils ont ainsi démontré que la méthode d'extraction d'ADN choisie conditionne les résultats des profils DGGE et donc la composition des communautés microbiennes étudiées.

La majorité des études en écologie microbienne utilise un seul kit pour l'extraction et la purification de l'ADN, choisi en fonction de la nature de l'échantillon (eau, aliment, sol, tissu animal ou végétal, biofilm...). De plus, afin d'améliorer le rendement d'extraction d'ADN, des méthodes de lyse mécanique sont souvent couplées à celles des lyses chimiques (**Champomier-Vergès *et al.*, 2015**).

Bien que l'utilisation du kit permette de gagner du temps et de cibler les microorganismes d'intérêt, la méthode d'extraction utilisant le phénol/chloroforme semble être plus efficace et plus intéressante pour notre étude. Elle permet d'obtenir des ADN très purs et de poids moléculaire relativement élevé (donc peu dégradés) en combinant plusieurs méthodes de lyses cellulaires. Il est toutefois important de souligner que le nombre limité des échantillons de cette expérience ne permet pas de conclure sur la fiabilité d'une méthode d'extraction de l'ADN par rapport à une autre. Également, afin d'optimiser les résultats, il aurait été intéressant d'effectuer des expérimentations permettant de tester l'efficacité de récupération des microorganismes à la surface des fruits et si les conditions optimales de lyse sont réunies. Notamment, en analysant la surface des fruits par microscopie électronique à balayage avant puis après l'étape de lavage à l'eau peptonée tamponnée.

Le but de notre étude étant de recueillir suffisamment d'information pour pouvoir faire une discrimination des fruits bio/non bio, et non de faire un inventaire exhaustif de l'ensemble des populations microbiennes que l'on peut retrouver associées à l'échantillon. Nous avons donc appliqué la méthode d'extraction utilisant le phénol/chloroforme pour l'ensemble de nos analyses.

De plus, de façon plus générale, l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire (extractions d'ADN, amplifications par PCR, application de méthodes d'empreinte...), pour l'étude des communautés microbiennes d'échantillons environnementaux, exige des stratégies reproductibles et efficaces. Afin de minimiser les biais expérimentaux, nous avons donc gardé les mêmes conditions d'expérience (amorces ADN, conditions d'amplification par PCR, gradient dénaturants...) et les mêmes appareillages pendant toute l'étude.

3.2. UTILISATION DE L'ÉCOSYSTÈME MICROBIEN POUR LA DISCRIMINATION DES FRUITS EN FONCTION DE LEUR MODE DE PRODUCTION : EXEMPLE DE LA POMME

Ce deuxième chapitre consiste à répondre à la question de recherche suivante : la flore microbienne des aliments varie-t-elle en fonction du mode de production ? Pour cela, nous avons appliqué la méthodologie de la PCR-DGGE qui a été optimisée durant les précédentes études réalisées au sein de l'équipe (**Le Nguyen *et al.*, 2008 ; Tatsadjieu *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2009, 2010, 2011, Duffossé, 2013**). Un protocole d'échantillonnage a été mis en place afin d'évaluer les variations ou les biais pouvant influencer significativement la flore microbienne des fruits (**cf. partie 2.1.2.**). Ainsi, des fruits bio et conventionnels provenant d'une même zone géographique et dont les parcelles étaient très proches ont été échantillonnés directement au champ de façon stérile. Les variations intraparcellaires (fruits échantillonnés à différents endroits de la parcelle) et temporelles (fruits échantillonnés sur deux années successives) ont également été mesurées et comparées aux variations induites par les pratiques agricoles (bio, conventionnelle) sur l'environnement microbien des fruits.

De façon générale, les échantillons pour notre étude ont été très difficiles à se procurer. En effet, rares sont les coopératives et les exploitations proposant des produits bio et non bio de même variété et de même origine géographique. Nous nous sommes également heurtés à une certaine méfiance des producteurs vis-à-vis de notre projet. Nous avons donc dû nous tourner vers des centres de recherche comme Invenio ou le Cirad de Martinique afin de pouvoir récolter et étudier des échantillons d'intérêt et pouvoir répondre à nos questions de recherche.

Nous avons choisi de présenter dans ce chapitre les résultats obtenus sur pommes. Ces fruits provenaient de parcelles de recherche (Invenio, Villeneuve-sur-Lot) à quelques heures de route du Cirad de Montpellier. Il nous a donc été possible de réaliser nous même les échantillonnages et d'effectuer les analyses rapidement. Nous avons pu récupérer un grand nombre d'échantillons (une centaine au total) dans des parcelles sur une zone d'environ 20 km (**Figure 2.2.** et **Tableau 2.2.**), et les étudier sur deux années consécutives. Il a également été possible d'avoir des informations très complètes sur les traitements et les parcelles, ce qui n'était pas le cas de tous les fruits étudiés durant ma thèse. Les résultats obtenus pour les autres échantillons seront présentés dans le chapitre 4 (« Application de l'approche à d'autres matrices alimentaires »).

3.2.1. Étude comparative des communautés microbiennes de pommes en fonction des modes de production

Les flores bactérienne et fongique présentes à la surface des pommes bio et conventionnelles cultivées à Invenio ont été analysées dans un premier temps pour mesurer l'impact des traitements au champ. Les extractions d'ADN génomique ont permis d'obtenir des extraits d'ADN dont la concentration était de 10 à 40 ng / μ L. Cette valeur peut sembler faible, mais elle correspond à l'ordre de grandeur retrouvé sur les aliments non-fermentés, comme les fruits, qui présentent un environnement paucimicrobien. Les ADN extraits ont ensuite été amplifiés par PCR avec des amorces universelles spécifiques à chaque type de microorganismes (fongiques et bactériens) puis les amplicons obtenus ont été séparés par DGGE suivant les protocoles énoncés dans le chapitre 2 « Matériels et Méthodes ».

Un total de 125 pommes a été étudié sur les deux années d'échantillonnages (2013 et 2014). Étant donné le nombre limité d'échantillons pouvant être analysés par expérience de DGGE, et la difficulté de regrouper les résultats obtenus entre différents gels (risque d'erreur élevé dû au nombre important de bandes, d'échantillons et à la migration pouvant varier entre les gels), chaque échantillon a été analysé dans plusieurs expériences indépendantes (gels DGGE différents) avec un échantillon en commun, servant de témoin, dans chacun des gels en plus des ADN références déjà inclus. Les gels les plus des résultats obtenus représentatifs illustrent ce chapitre.

3.2.1.1. Comparaison des empreintes globales fongiques

Pommes collectées en Novembre 2013

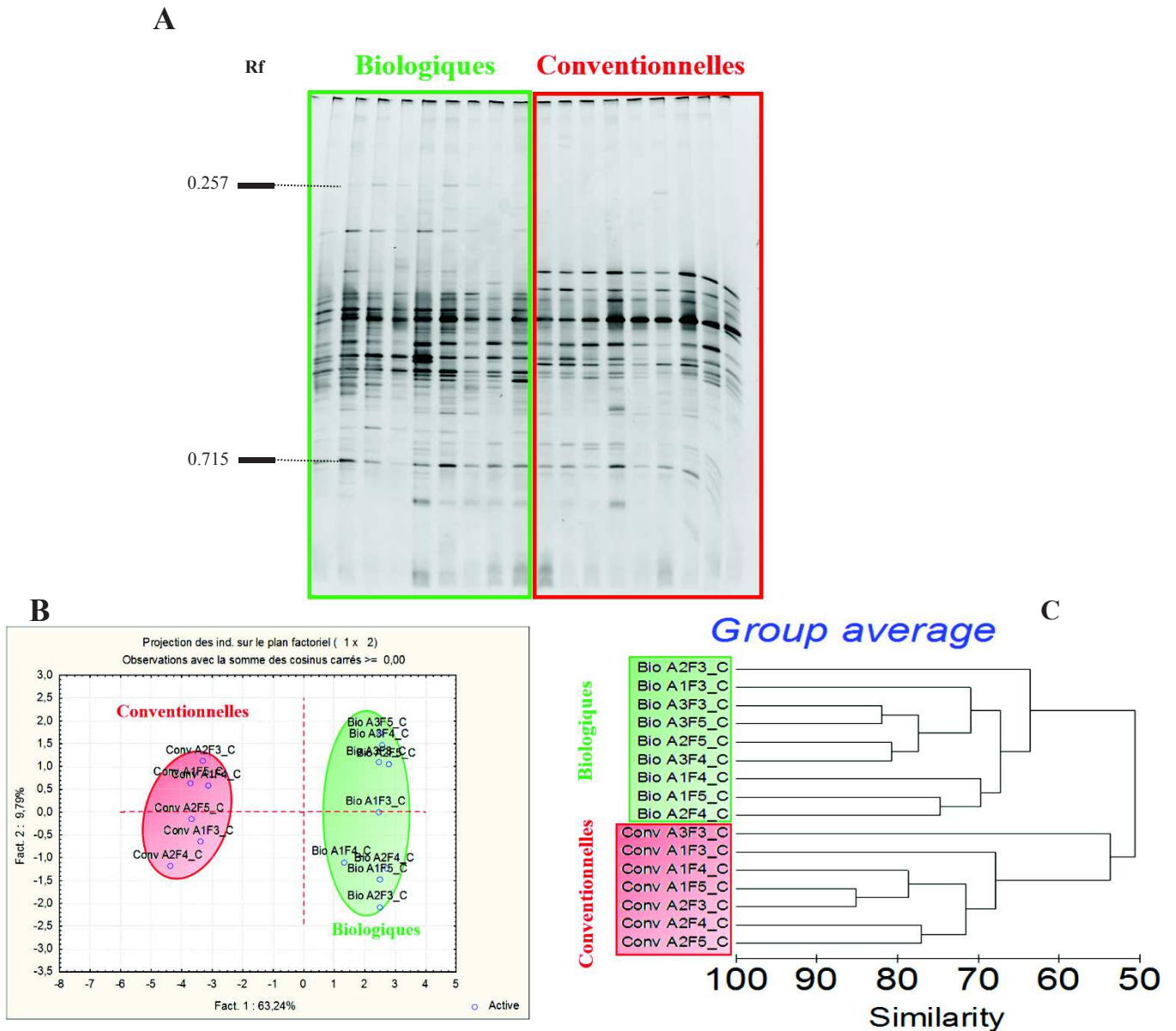


Figure 3.5. Profils DGGE des ADN_r fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2013 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

Pommes collectées en Novembre 2014

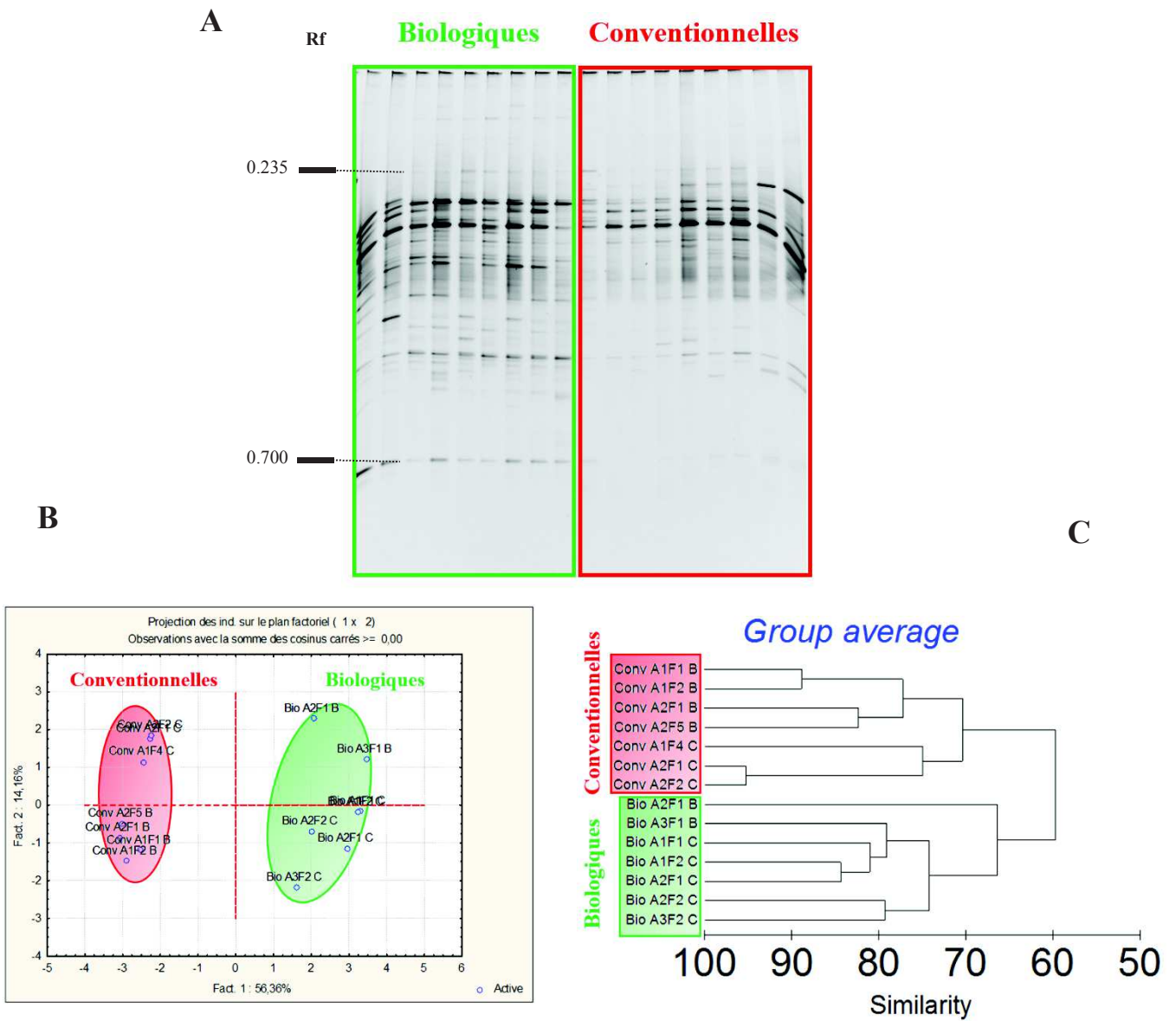


Figure 3.6. Profils DGGE des ADNr fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

L’observation des profils DGGE, qui correspondent à l’image de la flore fongique présente à la surface des pommes, montre peu de variations entre les profils d’un même type d’agriculture pour les deux années d’échantillonnage (**Figures 3.5.A et 3.6.A**). La variation inter-fruits est en effet très faible, avec une similarité allant de 65 à 90% entre des pommes issues d’un même mode de production (**Figure 3.5.C et 3.6.C**). Nous pouvons également constater que la flore fongique semble plus riche sur les fruits issus de l’AB comparé aux

fruits issus de l'agriculture conventionnelle. En effet, le nombre de bandes ADN (richesse fongique), et donc d'espèces fongiques, retrouvées sur les fruits est significativement plus important sur les fruits provenant de l'AB (**Tableau 3.2.**) : on détecte en moyenne 28 bandes dans les échantillons bio (2013, 2014 et à partir des pommes bio des deux parcelles étudiées) et 17 dans les échantillons conventionnels (2013, 2014 et à partir des pommes bio des deux parcelles étudiées). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les traitements chimiques autorisés en agriculture conventionnelle, en particulier les fongicides, détruiraient une grande partie de la flore fongique présente sur l'aliment.

Tableau 3.2. Nombre de bandes/espèces fongiques retrouvées sur les pommes étudiées.

| Agriculture | Nombre d'échantillons | Nombre de bandes DGGE (moyenne) | Test de Student |
|------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|
| Biologique | 65 | 28 | P < 0,05 |
| Conventionnelle | 60 | 19 | |

Les profils DGGE ont été comparés par analyses statistiques, de type ACP, qui nous ont permis d'obtenir une représentation graphique de l'ensemble de nos échantillons (**Figures 3.5.B et 3.6.B**), et donc, de pouvoir réaliser une étude exploratoire des données quantitatives (indices de Dice) obtenues à partir des matrices de similarité. Les graphiques permettent de constater que les fruits sont regroupés en fonction de leur mode de production. La somme des pourcentages des deux premières composantes informe que 70% de la variation dans l'échantillonnage est représentée. De plus, la première composante contribue à elle seule et majoritairement (Fact.1 = 50 à 60%) à la dissociation des deux groupes qui correspondent aux pommes bio et conventionnelles (**Figures 3.5.B et 3.6.B**). Ces résultats sont retrouvés sur les dendrogrammes (**Figures 3.5.C et 3.6.C**) qui illustrent bien les deux classes d'intérêt (conventionnelle et biologique) et complètent l'information apportée par l'ACP en chiffrant le degré de similarité : les individus (pommes) sont regroupés soit dans le cluster « Biologiques », soit dans le cluster « Conventionnelles » avec environ 70% de similarité entre les pommes d'un même groupe. Deux valeurs aberrantes ont été supprimées, elles correspondaient aux deux colonnes présentes aux extrémités des gels DGGE, où les bandes sont le plus souvent inclinées et donc non exploitables. Cela a été généralement le cas pour l'ensemble des gels DGGE de l'étude.

Ainsi, l'application de la PCR-DGGE nous a permis d'avoir une vision globale de la flore fongique présente à la surface des fruits, et de constater qu'elle était associée au mode de

production. Il serait donc possible d'utiliser cette flore fongique naturelle pour discriminer les fruits bio des conventionnels. Mais cet effet lié au type d'agriculture est-il dominant sur les autres paramètres qui influencent la flore microbienne des fruits ?

Vérification de la robustesse de l'approche

Après avoir étudié l'impact des pratiques agricoles sur la flore fongique des fruits, la PCR-DGGE a ensuite été appliquée afin d'estimer la variabilité qui pourrait être due à la position du fruit dans la parcelle (au centre ou au bord) ou à l'année d'échantillonnage (2013 vs 2014). Les analyses décrites plus haut avaient été réalisées indépendamment de la position des pommes dans la parcelle.

Le but était de vérifier si les variations dans la flore microbienne des fruits dues au type d'agriculture sont plus importantes que celles liées à l'année d'échantillonnage ou à la position du fruit dans la parcelle. Et donc de vérifier la robustesse des profils DGGE fongiques obtenus pour la discrimination des fruits bio des fruits conventionnels.

➤ **Étude de l'effet intra-parcellaire**

Toutes les pommes récupérées au bord d'une parcelle donnée (bio ou conventionnelle) ont été comparées avec celles prélevées au centre de cette même parcelle par PCR-DGGE, les pommes échantillonnées en 2013 ayant été étudiées séparément des pommes échantillonnées en 2014. Cela nous a permis de mesurer l'effet « intra-parcellaire » indépendamment de l'effet « traitements » et de l'effet « temporel ». L'ensemble des résultats obtenus ne sera pas illustré ici mais les analyses ACP et de clustering ont montré que les individus (pommes) avaient tendance à se regrouper en fonction de leur localisation dans la parcelle (bord vs centre). En effet, la comparaison de la flore fongique de fruits (bio ou conventionnels) récoltés au centre d'une parcelle avec des fruits prélevés au bord de cette même parcelle a montré qu'il existait une variation intra-parcellaire. Bien que cette différence soit minime, elle doit être prise en compte pour l'interprétation et la compréhension des résultats. Les échantillons avaient en effet tendance à se regrouper en fonction de la localisation du fruit dans la parcelle mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives : les dendrogrammes obtenus après l'analyse de regroupement ne permettaient pas de faire ressortir de clusters spécifiques et les analyses ACP ne permettent pas de différencier les échantillons (données non présentées). Les variations entraînées par l'effet intra-parcellaire sur l'écosystème microbien des pommes seraient donc négligeables. Des essais de PCR-DGGE ont ensuite été réalisés avec à la fois des échantillons prélevés à différents endroits

d'une même parcelle et issus des deux types d'agriculture (**Figure 3.7.**). Cela nous a permis de vérifier si les variations observées dans les communautés microbiennes liées au mode de production prédominent sur celles entraînées par la position du fruit dans la parcelle. La figure suivante illustre un exemple de gel DGGE réalisé pour répondre à cette hypothèse. Il s'agit des échantillons de pommes récoltés durant la deuxième année d'échantillonnage. Les résultats sont similaires avec ceux obtenus pour les pommes prélevées durant la première année d'échantillonnage.

Pommes collectées en Novembre 2014

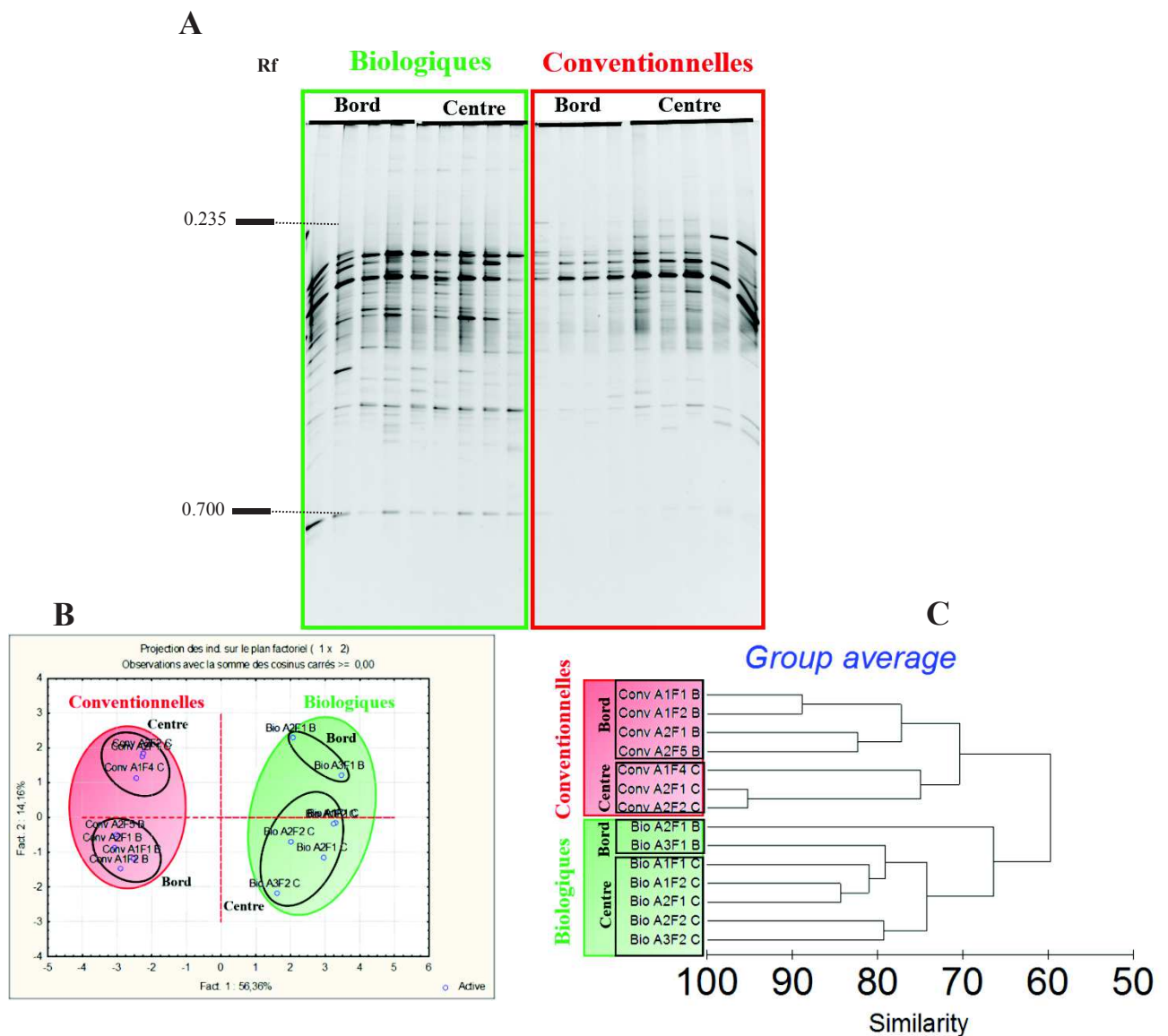


Figure 3.7. Profils DGGE des ADNr fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

L'analyse statistique de similarité (**Figure 3.7.**) conforte l'observation du gel DGGE puisque la flore fongique des pommes issues de l'AB se différencie de celle issue de l'agriculture conventionnelle avec 60% de similarité entre bio et conventionnel (**Figure 3.7.C**). Et ce, indépendamment de la localisation du fruit dans la parcelle. L'ACP est en accord avec les résultats de l'analyse de similarité. En effet, l'axe 1 permet de dissocier les échantillons par rapport à leur mode de production tandis que l'axe 2 les dissocie en fonction de leur localisation dans la parcelle. L'axe 1 contribuant davantage à la discrimination globale des échantillons que l'axe 2 (Fact.1 = 56,36% et Fact.2 = 14,16%), l'effet lié au mode de production apparaît donc plus important que celui lié à la position du fruit dans une parcelle.

La prochaine étape consistait à savoir si en incluant dans l'analyse des pommes bio issues d'une autre parcelle nous pourrions toujours différencier les deux types de fruits. Nous avons pour cela prélevé de façon aléatoire, durant la deuxième année d'échantillonnage, des pommes bio (n = 5) cultivées sur une autre parcelle de Invenio (parcelle de Ste Livrade certifiée bio depuis 2011).

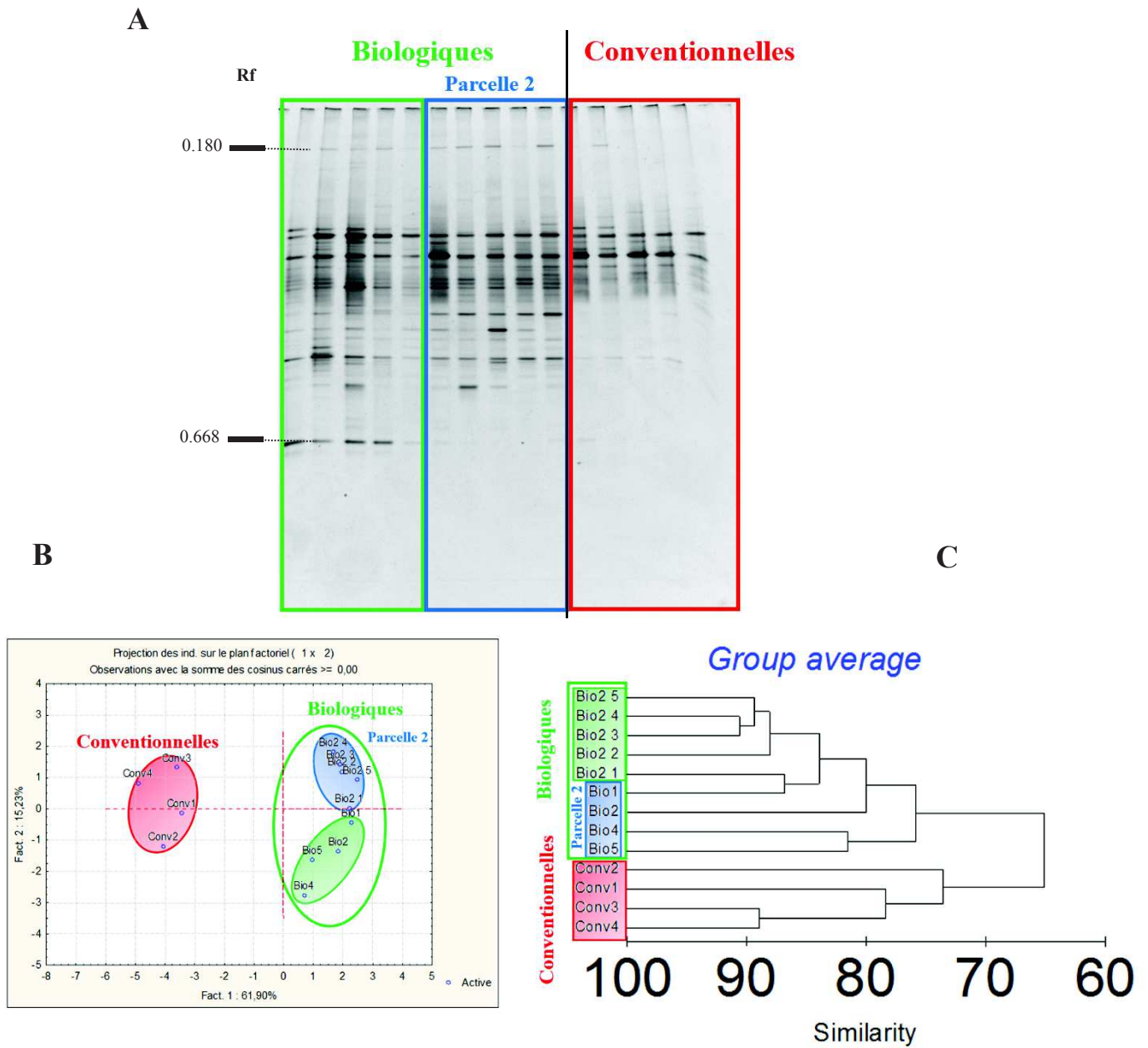


Figure 3.8. Profils DGGE des ADNr fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

« **Parcelle 2** » = pommes biologiques d'une autre parcelle.

Lorsque les données des pommes bio provenant d'une autre parcelle (**Parcelle 2** sur la **Figure 3.8.**) sont ajoutées à celles que nous avons obtenues pour les autres échantillons de pommes, les interprétations statistiques nous permettent de constater que ces pommes sont regroupées dans le cluster bio avec près de 75% de similarité (**Figure 3.8.B**). De plus, l'ACP, représentée avec deux facteurs, explique jusqu'à 75% des variations (**Figure 3.8.C**). La première composante principale contribue de façon significative (Fact.1 = 61,90%) à la dissociation des pommes bio des pommes conventionnelles (**Figure 3.8.B**). La deuxième composante dissocie principalement les pommes bio selon si elles proviennent de la Parcelle 2 ou de l'autre parcelle. Le pourcentage de cette deuxième composante étant faible (Fact.2 = 15,23%), ce paramètre n'influence donc pas majoritairement la composition de la communauté bactérienne des pommes.

Ces résultats ont été obtenus pour les échantillons de 2014 mais aussi pour les échantillons de 2013 (données non représentées). Cela souligne bien le fait que le mode de production a une plus grande influence sur la flore fongique des pommes par rapport à leur position dans la parcelle.

Nous sommes ensuite passés à l'étude de l'effet « temporel » (année d'échantillonnage) sur les profils fongiques obtenus par PCR-DGGE. Cela nous a permis de vérifier si les variations observées dans les communautés microbiennes liées au mode de production prédominent sur celles entraînées par l'année de récolte (2013 vs 2014).

➤ Étude de l'effet temporel

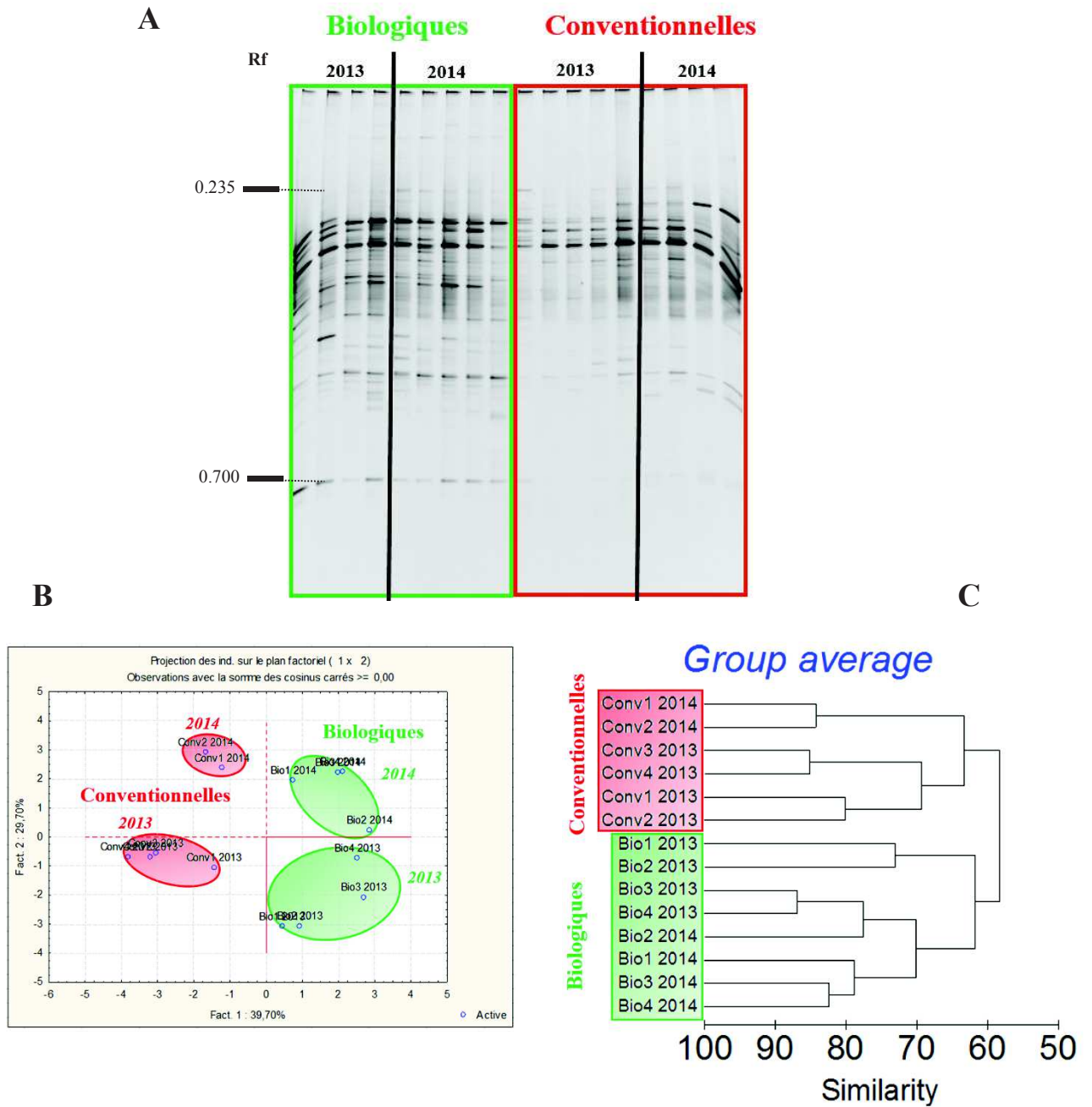


Figure 3.9. Profils DGGE des ADN_r fongiques extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2013 et en 2014 (A) avec les analyses ACP (B) et de clustering (C) correspondantes.

Les profils DGGE obtenus (**Figure 3.9.**) permettent d'avoir un aperçu des communautés fongiques présentes à la surface de pommes bio et conventionnelles échantillonnées sur deux périodes de récoltes différentes (2013 vs 2014). L'ACP, réalisée à partir des données extraites des profils DGGE fongiques, explique jusqu'à 70% de la variance sur les deux premières composantes (**Figure 3.9.B**). La première composante (Fact.1 = 39,70%) permet de séparer les échantillons en deux groupes distincts, « Biologiques » et « Conventionnelles ». La deuxième dissocie également les échantillons en deux groupes (Fact.2 = 29,70%), « 2013 » et « 2014 » (**Figures 3.9.B**). Cependant, l'axe 1 étant plus important que l'axe 2 (Fact.1 = 39,70%), cela indique que le type d'agriculture influence de façon majoritaire la composition de la structure des communautés fongiques. Le dendrogramme de la **Figure 3.9.C** conforte les interprétations de l'ACP. Il démontre que la flore fongique des pommes issues de l'AB se différencie de celle présente à la surface des pommes conventionnelles, avec plus de 60% de similarité entre des pommes provenant d'un même mode de production (bio ou conventionnel). Et ce, indépendamment de l'année d'échantillonnage des fruits.

La même méthodologie a ensuite été appliquée, cette fois-ci pour la comparaison de l'empreinte génétique bactérienne afin de savoir si, tout comme la flore fongique, la flore bactérienne pouvait être utilisée pour la discrimination des pommes en fonction de leur mode de production.

3.2.1.2. Comparaison des empreintes globales bactériennes

De la même façon que pour l'étude de la flore fongique, les profils d'ADNr 16S ont été générés à partir des mêmes fruits et analysés par ACP. Ces analyses par ACP ne nous ont pas permis d'établir une relation très forte entre les profils DGGE et le mode de production où étaient issues les pommes. En effet, dans l'exemple donné (**Figure 3.10.**), on constate que les individus tendent à se regrouper entre eux en fonction du type d'agriculture par l'axe 2, mais le pourcentage obtenu est très faible (Fact.2 = 20,62%). Les marqueurs ADN bactériens, qui permettraient d'établir une relation entre les profils DGGE bactériens et les pommes bio ou conventionnelles, semblent représenter une trop faible variation relative par rapport à la variation globale de l'ensemble des données. Autrement dit, l'information apportée par ces marqueurs ADN bactériens serait masquée par les autres espèces bactériennes qui ne présenteraient pas d'intérêt pour la discrimination.

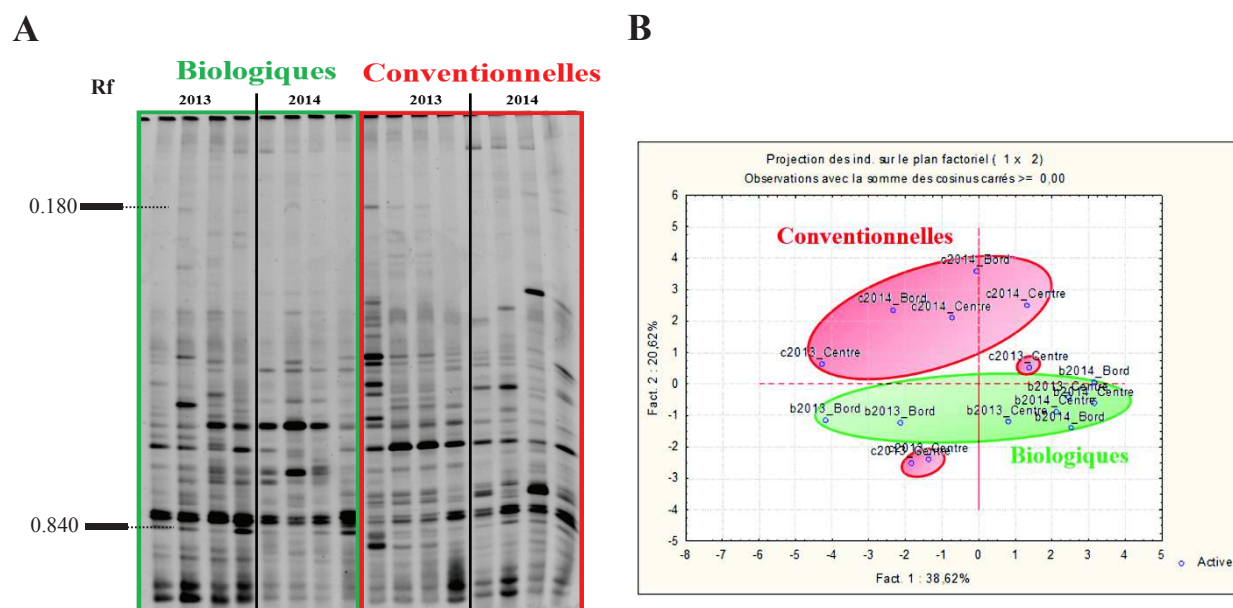


Figure 3.10. Profils DGGE des ADNr bactériens (A) extraits à partir de pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2014 et 2013, au bord et au centre des parcelles, avec les analyses ACP (B) correspondantes.

*c = conventionnelle

*b = biologique

De plus, la comparaison du nombre de phylotypes (bandes ADN) retrouvé après DGGE nous indique qu’il n’y a pas de différence significative dans la richesse bactérienne (nombre de bandes) des fruits bio par rapport aux fruits non bio (**Tableau 3.3.**).

Tableau 3.3. Nombre de bandes/espèces bactériennes retrouvées sur les pommes étudiées.

| Agriculture | Nombre d'échantillons | Nombre de bandes DGGE (moyenne) | Test de Student |
|------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|
| Biologique | 65 | 33 | P > 0,05 |
| Conventionnelle | 60 | 30 | |

Nous nous sommes donc intéressés à l’abondance bactérienne (intensité des bandes) retrouvée sur les profils DGGE. Mais pour avoir une meilleure connaissance de la variabilité entre les groupes (bio vs non bio), en utilisant à la fois la richesse et l’abondance bactérienne retrouvée dans les profils DGGE, une autre méthode statistique a été utilisée. En effet, l’outil statistique à appliquer devait nous permettre d’utiliser un nombre de descripteurs supérieur (bandes ADN) au nombre d’observations (type d’agriculture), et de tolérer les données

manquantes (valeur de l'intensité parfois nulle, due à l'absence de détection d'une bande dans un échantillon donné). Il était également intéressant d'avoir la possibilité de sélectionner les variables explicatives (bandes ADN) les plus significatives pour notre analyse et donc les plus discriminantes. Pour ces raisons, la méthode de PLS-DA semblait la plus appropriée. La PLS-DA est une technique de régression qui maximise la séparation entre les classes prédéfinies. Pour cela, elle combine les variables explicatives (X) en une ou plusieurs composantes indépendantes qui décrivent mieux la variable dépendante (Y). La significativité statistique du modèle ainsi créé et des composantes est exprimée par la valeur Q^2 qui représente la proportion de variabilité expliquée. Cet outil statistique permet également de tester la validité du modèle (Q^2), en évaluant l'importance relative des différentes variables explicatives et en identifiant le sens des relations.

Ainsi, pour pouvoir créer la matrice permettant d'interpréter les données DGGE de la **Figure 3.10.**, 2 classes (bio et conventionnelles) ont été définies et décrites par 62 variables quantitatives. Ces dernières correspondent aux bandes totales détectées dans le gel DGGE. Le nom de la classe (bio ou conventionnelle) a été affilié aux 16 variables qualitatives (= 16 pommes) qui constituaient cette matrice. Le fait que le nombre d'observations soit beaucoup moins important par rapport au nombre de variables explicatives du modèle ne remet pas en cause la pertinence et la qualité de cette méthode d'analyse (**Wold 1987**). La PLS-DA a ensuite été appliquée pour trouver une corrélation entre les classes prédéfinies et les variables. La même démarche a été faite pour l'interprétation de toutes les empreintes bactériennes obtenues après analyse par DGGE. Notre but étant de tester si les variables descriptives permettent de distinguer les modes de production, puis de représenter les données dans l'espace factoriel afin de vérifier visuellement si les modes de production peuvent être différenciés.

Les résultats de l'analyse par PLS-DA sont illustrés dans la **Figure 3.11.** où sont représentées la dispersion des individus d'une part (ADN bactériens) et la dispersion des observations (échantillons bio et conventionnels) d'autre part.

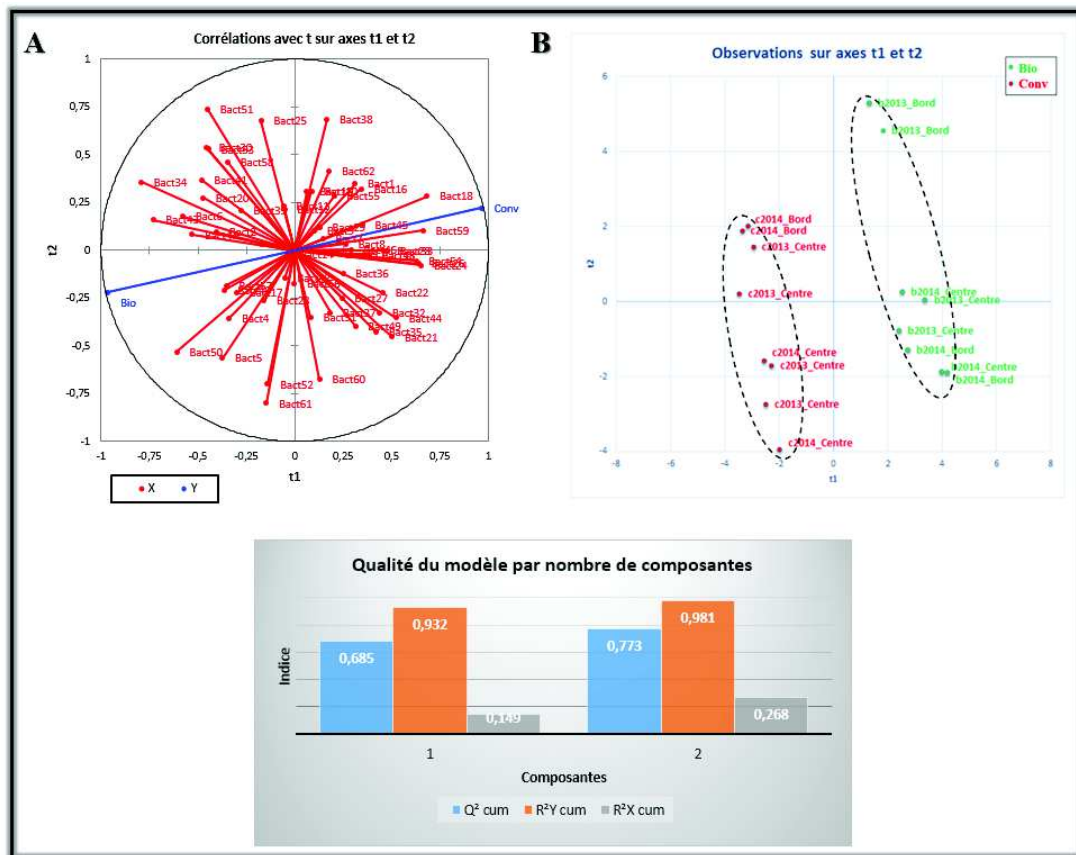


Figure 3.11. Graphiques des corrélations générés par l'analyse discriminante PLS.

Sont représentées, sur les deux premières composantes, (A) les corrélations entre les variables X (Bactn*) et les variables Y du modèle (Bio/Conv) et (B) la répartition des individus sur les axes t à partir des variables explicatives initiales.

Les classes biologique (Bio) et conventionnelle (Conv) sont représentées en bleu, les variables explicatives quantitatives (X) en rouge dans le graphique.

*Bactn = Bactérie + numéro (ou bande du gel DGGE)

*b2013 ou b2014 = pommes biologiques de 2013 ou 2014

*c2013 ou c2014 = pommes conventionnelles de 2013 ou 2014

Les valeurs R²Y cum et R²X cum correspondent aux corrélations entre les composantes et les variables tandis que l'indice Q² cumulé (Q²cum) est une mesure globale de la qualité de l'ajustement et de la qualité prédictive de notre analyse. Plus les valeurs sont proches de 1, meilleur est notre modèle. Le premier graphique des corrélations (A) permet de visualiser sur les deux premières composantes générées par l'analyse discriminante PLS les corrélations entre les X et les Y du modèle. Les variables les mieux représentées sont celles qui sont proches ou sur le cercle de corrélation. Ce graphique montre que les pommes bio et conventionnelles sont corrélées négativement et que certaines variables quantitatives (représentées en rouge et appelées « Bactn ») contribuent plus à la discrimination par rapport à d'autres. De plus, les résultats de l'analyse PLS-DA représentés dans la **Figure 3.11.**

démontrent que les pommes se différencient en fonction de leur mode de production en basant la discrimination sur seulement 26% de la variabilité globale des variables X ($R^2X_{cum} = 0,268$). Les histogrammes représentant la “Qualité du modèle par nombre de composantes”, indiquent que notre modèle est validé avec une valeur R^2Y égale à 0,9 et une valeur de Q^2_{cum} supérieure à 0,5, ce qui signifie que notre modèle est prédictif.

La matrice de confusion (**Tableau 3.4.**), ou table d'affectation, résume l'information concernant les reclassements d'observations et permet ainsi de déduire les taux de bon et de mauvais classement. Elle accompagne systématiquement les analyses par PLS-DA. Le "% correct" correspond au rapport du nombre d'observations bien classées, sur le nombre total d'observations. D'après les résultats, le taux de bons classements s'établit donc à 100%.

Tableau 3.4. Matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation.

| De \ Vers | Agriculture-Bio | Agriculture-Conv | Total | % correct |
|------------------|-----------------|------------------|-------|-----------|
| Agriculture-Bio | 8 | 0 | 8 | 100% |
| Agriculture-Conv | 0 | 8 | 8 | 100% |
| Total | 8 | 8 | 16 | 100% |

Bien que la discrimination des pommes bio des conventionnelles soit significative, notre modèle serait plus robuste avec des valeurs R^2X plus élevées. En effet, les valeurs de R^2X , pour l'ensemble des analyses PLS-DA réalisées, étaient faibles (autour de 0,15 sur la première composante et 0,25 sur la deuxième pour l'ensemble de nos modèles), ce qui signifie que les composantes étaient bien représentatives des Y (correspondant aux classes Biologiques et Conventionnelles) mais pas des X (correspondant aux variables explicatives = bandes ou espèces bactériennes présentes dans un gel). Nos jeux de données DGGE fournissent donc un trop grand nombre de variables explicatives X par rapport au nombre d'individus (pommes). La sélection ou la suppression des variables explicatives non significatives nous permettrait non seulement d'améliorer notre modèle mais également de faire ressortir les variables explicatives les plus informatives et donc les plus discriminantes.

Pour réduire le nombre de variables et ne conserver que les espèces bactériennes les plus discriminantes à prendre en compte dans notre modèle, nous avons appliqué l'analyse des VIP (Variable Importance in the Projection). Cette analyse permet d'estimer l'importance de chacune des variables X dans la construction de Y à partir du modèle, et donc dans la construction des fonctions discriminantes. Les VIP sont d'ailleurs souvent utilisées pour la

sélection des variables les plus discriminantes en écologie microbienne (Li *et al.*, 2010 ; Schippa *et al.*, 2010 ; Lif Holgerson *et al.*, 2011). Une variable ayant un score de VIP proche ou supérieur à un 1 est considérée comme importante dans un modèle de PLS donné (Eriksson *et al.*, 1999 ; Tenenhaus, 1998). Le choix du score est généralement arbitraire mais les VIP ayant une valeur supérieure ou égale à 1 ont permis d'améliorer notre modèle et ont donc été conservées. Les autres ont été exclues du modèle (Figures 3.12. et 3.13.).

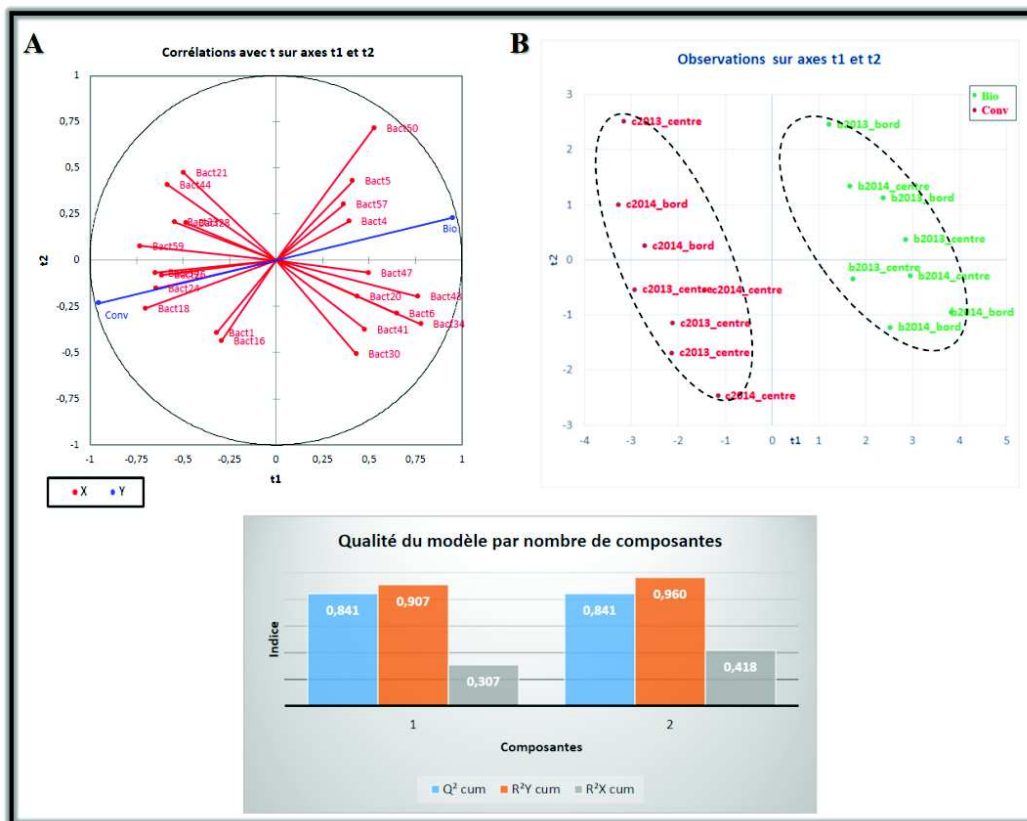


Figure 3.12. Graphiques des corrélations générés par l'analyse discriminante PLS.

Sont représentées, sur les deux premières composantes, les corrélations entre les variables X (Bactn*) et les variables Y du modèle (Bio/Conv) (A) et la répartition des individus sur les axes t à partir des variables explicatives initiales (B).

Les classes biologique (Bio) et conventionnelle (Conv) sont représentées en bleu, les variables quantitatives (X) en rouge dans le graphique.

*Bactn = Bactérie + numéro (ou bande du gel DGGE)

*b2013 or b2014 = pommes biologiques de 2013 ou 2014

*c2013 or c2014 = pommes conventionnelles de 2013 ou 2014

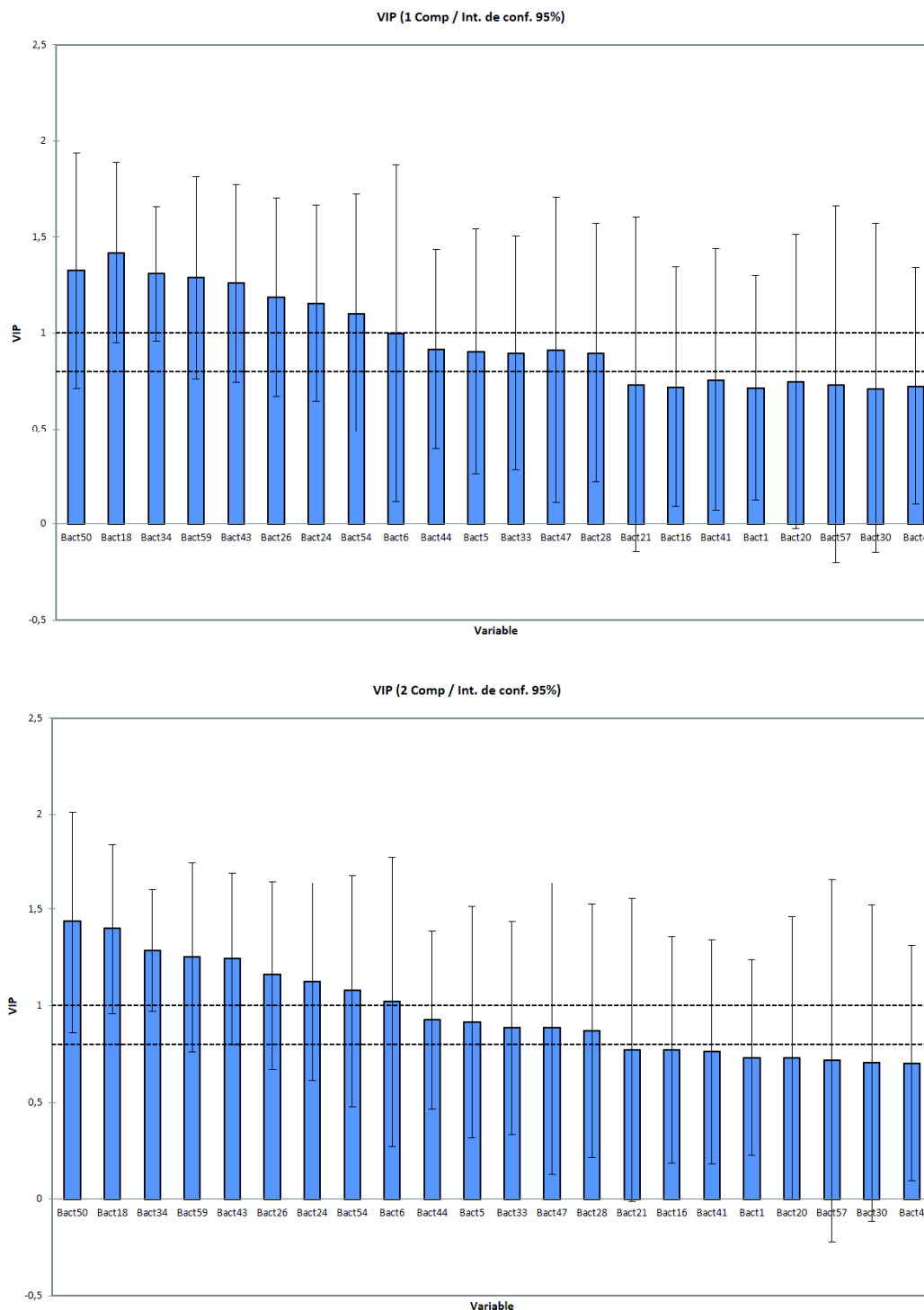


Figure 3.13. Résultats de la régression PLS montrant l'importance des différentes variables X (Bactn) dans le modèle (VIP) sur les deux composantes.

Cette sélection de variables nous a permis d'améliorer non seulement les valeurs de R^2X (qui ont doublé sur les deux composantes comparé aux résultats de la **Figure 3.11.**) mais aussi la qualité de notre modèle Q^2cum (dont la valeur a augmenté de 10% par rapport à ce qui avait été obtenu dans la **Figure 3.11.**). Les résultats de la matrice de confusion indiquaient

que le taux de bons classements s'établissait toujours à 100%. Sur les 62 bandes initialement utilisées pour la discrimination des pommes, 22 ont été identifiées comme étant les plus significatives ($P < 0,05$) et considérées importantes pour notre modèle (l'ajout ou l'exclusion d'autres données apportées par des bandes n'améliorait pas notre modèle justifiant ainsi la sélection de ces 22 variables). On peut par ailleurs constater que ces variables permettent soit d'expliquer la classe « Bio » soit la classe « Conv » (**Figure 3.12.A**). Plus les variables explicatives X tendront vers une classe et seront proches du cercle de corrélation, meilleure sera leur représentation sur le graphique, et donc cela signifie qu'elles contribuent le mieux à notre modèle.

De plus, le graphique VIP (**Figure 3.13.**) nous a permis de voir l'importance des variables X dans la construction des composantes et de sélectionner celles qui étaient les plus discriminantes pour notre modèle. Les écart-types obtenus sont très importants mais cela s'explique par la présence de données qui sont considérées aberrantes en statistiques mais qui sont intéressantes et explicables par des raisons biologiques. En effet, des valeurs extrêmes sont présentes dans nos matrices de données puisque certaines espèces bactériennes (variables X) peuvent être retrouvées sur les fruits bio et non sur les fruits conventionnels et vice versa (ou en très faible/forte abondance).

3.2.1.2.3. Conclusion partielle

Ainsi, l'étude de la flore bactérienne présente à la surface de fruits issus de différents modes de production indique que les traitements ont une influence significative sur les microorganismes présents à la surface des pommes. De plus, il a été possible de mesurer cet impact à l'aide d'une méthode d'analyse globale des ADNr microbiens en combinant l'étude de la richesse (nombre de bandes) avec celle de l'abondance bactérienne (intensité de ces mêmes bandes). Par ailleurs, il a été précédemment constaté que l'analyse de la richesse fongique (nombre de bandes) était suffisante pour réaliser la discrimination des fruits bio des fruits conventionnels. Les espèces bactériennes et fongiques ne contribuent donc pas de la même façon à cette discrimination.

Comme pour l'étude des profils génétiques fongiques, nous avons vérifié si les variations induites par d'autres facteurs pouvaient être comparées à celles des traitements au champ.

La même démarche d'analyse que celle réalisée sur ADN fongiques a été appliquée : après avoir mesuré l'influence des traitements sur la flore bactérienne des fruits, la PCR-DGGE a été réalisée afin d'estimer les variations qui pourraient être dues à la position du fruit dans la parcelle (au centre ou au bord) ou à l'année d'échantillonnage (2013 vs 2014). Aussi, des pommes bio (n = 5) cultivées sur une autre parcelle de Invenio (Parcelle 2) ont également été intégrées à l'analyse afin d'observer dans quelle classe (bio vs conventionnelle) elles allaient être représentées.

Les différents facteurs pouvant impacter sur la composition de la flore bactérienne présente à la surface des pommes ont été étudiés séparément dans un premier temps puis l'ensemble a été analysé dans un même gel DGGE afin de connaître le facteur qui entraîne le plus de variations au niveau de la flore bactérienne et donc des profils DGGE. Ce gel est illustré dans la **Figure 3.10.A** et les interprétations statistiques sont données dans la **Figure 3.11.** Comme cela avait déjà été décrit pour l'étude de la flore fongique, il a été observé que la position des fruits dans la parcelle et l'année d'échantillonnage influent sur la composition de la flore bactérienne. Les analyses statistiques indiquaient que les échantillons semblaient aller tendanciellement vers un groupe donné (bord vs centre ou 2013 vs 2014 ou échantillons bio de la parcelle étudiée sur deux années vs échantillons bio de la « Parcelle 2 »). Cependant, les résultats des analyses de PLS-DA (**Figure 3.11.**) démontrent que les variations entraînées par ces facteurs étaient moins importantes que l'effet des traitements appliqués aux fruits.

3.2.2. Conclusion

L'application de la PCR-DGGE pour l'analyse de la flore microbienne au niveau moléculaire de pommes issues des systèmes de production bio et conventionnels a montré qu'il existe une signature spécifique du mode de production permettant de différencier statistiquement les produits en fonction de leur traitement. La robustesse de notre méthodologie a été vérifiée en comparant les résultats obtenus sur deux années de récolte successives. Nous avons également pu estimer l'effet intra-parcellaire et observer que les fruits pouvaient être discriminés en fonction de leur mode de production indépendamment de leur position dans la parcelle. De même, notre approche a été testée et validée par l'analyse de la flore microbienne de pommes bio provenant d'une autre parcelle bio. Les résultats sont concluants et montrent que les différences observées dans la microflore des fruits sont suffisamment importantes pour conclure qu'elles proviennent principalement, voire exclusivement, des traitements appliqués au champ.

Des variations importantes ont été observées sur les profils DGGE pour l'analyse de la flore bactérienne de pommes issues d'un même mode de production. Ceci pourrait être expliqué par le type de traitement appliqué sur les pommiers. En effet, les traitements utilisés au champ sont principalement orientés pour la lutte contre les maladies fongiques (**cf. partie 2.1.3.**), comme la tavelure, l'oïdium ou certaines maladies de conservation. L'emploi important de fongicides amènerait donc davantage de modifications sur la flore fongique que sur la flore bactérienne. Les variations mesurées entre profils DGGE bactériens étaient alors trop importantes pour permettre une classification en utilisant les analyses ACP. L'amélioration importante des résultats obtenus en appliquant la PLS-DA montre clairement que les informations fournies par les profils de DGGE bactériens étaient partiellement masquées par une variabilité biologique naturelle des pommes. La PLS-DA a en effet permis de construire des modèles hautement significatifs (Q^2 cum allant de 60 à 80% selon le modèle) et de discriminer efficacement les pommes en fonction du type d'agriculture dont elles étaient issues. Ces modèles étaient constitués de deux composantes et permettaient d'expliquer plus de 95% de la variance (R^2Y). Elle s'est avérée particulièrement utile lorsque l'on souhaite prédire un ensemble de variables dépendantes à partir d'un ensemble très grand de variables explicatives (prédicteurs) qui peuvent être très fortement corrélées entre elles.

Cependant, bien que la discrimination des pommes bio des conventionnelles ait été claire grâce à l'analyse globale de leur flore microbienne, le niveau de similarité entre les groupes bio et conventionnels se situait entre 50 et 60% (voir les dendrogrammes des **Figures 3.5. à 3.9.**). Le fait que l'on apporte une grande quantité d'information (analyse globale de la flore microbienne), et qu'il n'y ait qu'un seul facteur qui soit considéré dans notre modèle (type d'agriculture), expliquerait ce niveau de similarité élevé. Il a été démontré, via les analyses de VIP, qu'une recherche plus ciblée des microorganismes (les bactéries mais aussi les levures/moisissures) présents sur les fruits bio ou conventionnels permettait d'augmenter la qualité de notre modèle.

L'application de la PLS-DA sur les profils DGGE nous a également permis de constater que l'analyse combinée de la richesse (nombre de bandes) et de l'abondance microbienne (intensité des bandes), et donc l'analyse de la diversité microbienne globale, avait conduit à une discrimination efficace des échantillons en fonction de leur mode de production. Cela nous a amené à nous demander si un paramètre était plus important par rapport à un autre. Les profils fongiques obtenus après DGGE contenaient un nombre de

bandes ADN supérieur dans les échantillons bio par rapport aux conventionnels. Ceci nous a amené à conclure que la richesse fongique serait plus importante dans les produits bio et nous a permis de réaliser une discrimination significative. À l'inverse, ce paramètre seul n'était pas suffisant pour permettre de réaliser cette discrimination des fruits à partir de l'étude de leur flore bactérienne : il a fallu prendre en compte à la fois le nombre de bandes et leur intensité.

Les traitements appliqués aux fruits, en particulier fongicides, influencent donc l'écosystème microbien des pommes. Le niveau d'influence (abondance et/ou richesse) dépendrait du type de flore microbienne considéré.

3.3. CARACTÉRISATION DES VARIATIONS DE LA FLORE MICROBIENNE DES POMMES BIOLOGIQUES ET CONVENTIONNELLES

Dans ce troisième chapitre, le but était de comprendre à quel niveau il était possible d'expliquer les différences mesurées entre les flores microbiennes présentes sur les pommes bio comparées aux conventionnelles. Nous avons tout d'abord cherché à estimer la diversité des communautés microbiennes étudiées à partir des profils DGGE pour tenter de la comprendre et de l'interpréter. La richesse et l'abondance microbienne ont également été étudiées par qPCR et HRM puis comparées aux données obtenues par analyse DGGE.

Une partie de ce chapitre sera consacrée à l'identification des espèces fongiques et bactériennes qui composent les communautés microbiennes retrouvées sur les pommes. Notre but était de savoir s'il était possible d'identifier des taxons microbiens qui seraient spécifiques des pommes issues de l'AB et/ou conventionnelle. Pour cela les bandes ADN isolées par analyse DGGE ont été purifiées et séquencées pour identification. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par séquençage à haut débit en utilisant la méthode Illumina.

3.3.1. De la vision globale de la diversité microbienne retrouvée à la surface des pommes...

3.3.1.1. Estimation de la diversité microbienne associée aux pommes

➤ Application de l'indice de diversité de Simpson

L'indice de diversité de Simpson sert à mesurer la probabilité que deux individus sélectionnés aléatoirement appartiennent à la même espèce (**Simpson, 1949**). La valeur de cet indice varie entre 0 (diversité minimale) et 1 (diversité maximale). Donc, plus elle se rapprochera de 0, plus les chances d'obtenir des individus d'espèces différentes seront élevées. L'indice de Simpson a été appliqué pour comparer les profils DGGE en étudiant simultanément deux paramètres : la richesse des échantillons (surface des fruits) et l'abondance relative de chaque espèce microbienne. Cet indice est l'un des plus couramment utilisé par la communauté scientifique pour estimer la diversité des communautés microbiennes étudiées par empreinte moléculaire (**Haegeman et al., 2008**). En effet, les techniques d'empreinte moléculaire ne permettent pas de connaître la richesse réelle de l'échantillon du fait que les espèces dominantes masquent les espèces minoritaires (**Forney et al., 2006 ; Pedros-Alio, 2006**), or l'indice de Simpson est indépendant de la distribution de l'abondance relative et de la richesse réelle de l'échantillon.

Pour appliquer cet indice de diversité, nous avons généré des données à partir du nombre de bandes ADN (richesse) et de leur intensité (abondance) mesurés à partir des photos de gel DGGE en utilisant le logiciel PAST version 3.04 (**Hammer et al., 2001**). À ce jour, il n'existe aucune référence disponible sur les indices de diversité. Cela est en effet trop dépendant du contexte technique (extraction et amorces ADN, amplification par PCR, méthode d'empreinte moléculaire utilisée, etc...). Nous avons donc appliqué des tests statistiques de comparaison des moyennes (test de Student et ANOVA) afin de déterminer s'il existait une différence significative entre les échantillons bio et conventionnels au niveau de la diversité de leur flore microbienne. Ces tests ont également été effectués pour comparer les résultats obtenus en fonction de l'année de prélèvement et de la localisation des fruits dans la parcelle (bord vs centre). Ceci afin de compléter et éventuellement expliquer les différences mesurées dans nos précédents résultats (**cf. partie 3.2.**).

Dans un premier temps, l'indice de diversité de Simpson a été appliqué sur les profils bactériens et fongiques obtenus par DGGE réalisée pour l'étude des 125 pommes (65 pommes bio et 60 conventionnelles). Puis, afin d'évaluer précisément la probabilité qu'une différence (si elle existe) puisse être due au hasard (p-value), des tests paramétriques de Student et des ANOVA ont été réalisés sur les différentes classes de pommes (bio vs conventionnelles ; bord vs centre ; 2013 vs 2014) après avoir vérifié que les données suivaient une loi normale (test de Shapiro-Wilk : $p > 0,05$).

Tableau 3.5. Analyse comparative de la diversité microbienne retrouvée sur les pommes biologiques et conventionnelles échantillonnées en 2013 et 2014.

| Agriculture | Nombre d'échantillons | Diversité moyenne (Simpson) | | Test de Student paramétrique | |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| | | Flore fongique | Flore bactérienne | Flore fongique | Flore bactérienne |
| Bio | 65 | 0,9533 | 0,9671 | P > 0,05 | P > 0,05 |
| Conventionnelle | 60 | 0,9452 | 0,9709 | | |

Les résultats nous indiquent que la moyenne de la diversité de Simpson obtenue pour les différents échantillons de pommes était égale à 0,95 pour la flore fongique et 0,97 pour la flore bactérienne (**Tableau 3.5.**). Les tests paramétriques de Student et les ANOVA démontrent que cette diversité microbienne est équivalente entre les échantillons, quel que soit leur mode de production, leur localisation dans la parcelle ou leur année d'échantillonnage ($p > 0,05$).

Le mode de production n'impacte donc pas globalement la diversité microbienne des fruits mais agirait plutôt sur l'un ou les deux paramètres qui caractérisent cette diversité, c'est-à-dire la richesse et/ou l'abondance microbienne. Au vu des résultats obtenus par analyse DGGE, cela dépendrait du type de flore qui est ciblée (fongique ou bactérienne). En effet, un plus grand nombre de bandes a été retrouvé dans les profils DGGE fongiques pour les pommes bio (28 bandes ADN contre 19 pour les pommes conventionnelles). Au contraire, au niveau bactérien, un nombre équivalent de bandes ADN (en moyenne 30 bandes ADN) a été retrouvé sur les pommes bio et conventionnelles mais avec une abondance (intensité des bandes) différente. Les pommes bio semblent donc arborer une flore fongique plus riche et une flore bactérienne plus abondante par rapport aux pommes conventionnelles.

Pour approfondir l'analyse, l'identification des bandes ADN d'intérêt récupérées à partir des empreintes microbiennes (DGGE) a été réalisée par séquençage afin d'identifier les espèces majoritaires et ainsi avoir un aperçu de la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des pommes bio et conventionnelles. Mais aussi pour savoir s'il était possible de retrouver des taxons bactériens et fongiques spécifiques d'un mode de production, donc soit sur les pommes bio soit sur les pommes conventionnelles. Dans un deuxième temps, l'abondance et la richesse microbiennes ont été estimées respectivement par PCR quantitatives et HRM.

➤ Identification des espèces microbiennes (séquençage des bandes ADN extraites des analyses par DGGE)

Certains marqueurs (bandes) ADN peuvent être présents dans un échantillon mais pas dans un autre, alors que ces deux échantillons provenaient de la même parcelle. Ceci peut être expliqué par le fait que chaque échantillon représente la flore fongique ou bactérienne globale présente à la surface d'une seule pomme : par exemple, il est possible qu'un insecte (et/ou une fiente d'oiseau par exemple) se soit posé sur cette pomme et lui ait transmis certains microorganismes dont il est naturellement porteur. Cela n'a pas eu d'impact au niveau de l'interprétation, mais il a fallu prendre en considération cette variabilité pour sélectionner les marqueurs ADN les plus discriminants à identifier. Dans certains cas, il n'a pas été possible d'obtenir la séquence de toutes les bandes obtenues par DGGE. Le choix a donc été orienté vers les bandes qui étaient généralement présentes dans tous les fruits issus d'un même mode de production.

53 séquences fongiques différentes ont été identifiées au total ainsi que 28 séquences différentes de bactéries. Les séquences ont été identifiées en utilisant les bases de données publiques (GenBank sur le site de NCBI). Celles qui ont été retenues présentaient un pourcentage d'identité compris entre 95 et 100%. Certaines identifications ont pu être réalisées au niveau de l'espèce mais, pour la majorité, le niveau de résolution était au niveau du genre, voire de la classe. En effet, même avec une séquence de qualité, sans co-migration, il était difficile d'identifier avec certitude une espèce. Le plus souvent, lorsque l'on a comparé la séquence à identifier à celles de la banque de données, nous avons quelquefois obtenu plusieurs propositions d'espèces pour des pourcentages d'identités et de recouvrement identique. Ceci est dû au fait que la taille de notre séquence est trop courte (< 250 pb) pour pouvoir obtenir une identification précise. De plus, au vu du nombre important de bandes obtenues, il n'a pas été possible de toutes les identifier. Malgré tout, les séquences étudiées ont permis d'identifier la flore microbienne majoritairement présente à la surface des pommes, mais également d'identifier les taxons qui seraient spécifiques aux pommes issues d'un mode de production donné. Certains marqueurs/bandes ADN étaient retrouvés sur les deux types de fruits mais différaient par leur abondance apparente (intensité).

Afin de vérifier l'appartenance des marqueurs/espèces identifiés à un mode de production spécifique, le logiciel d'analyse d'images ImageQuant (TL version 2007, Amersham Biosciences, USA) a été utilisé (cf. **partie 2.2.3.2.3.**).

3.3.1.2.1. Identification des espèces fongiques associées aux pommes

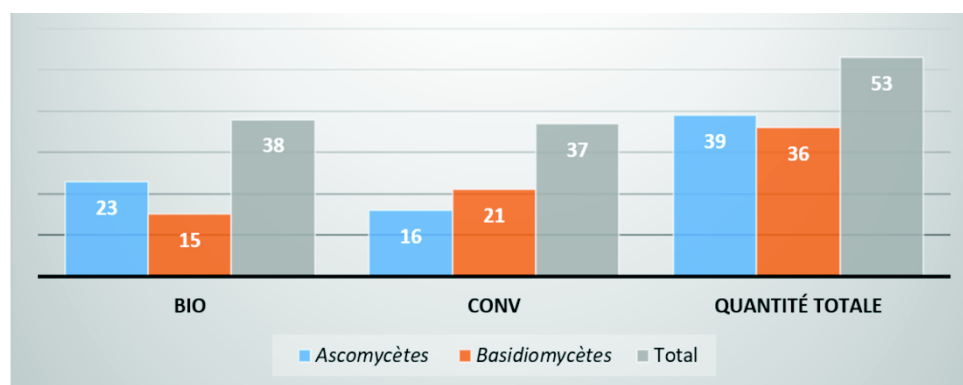


Figure 3.14. Répartition des ADN fongiques identifiés en fonction de leur appartenance à une division (*Ascomycètes* vs *Basidiomycètes*) ou à un mode de production (BIO vs CONV).

*Bio = Biologique *Conv. = Conventiionnelle

Le séquençage des bandes ADN fongiques obtenues à partir des profils DGGE, montre que les espèces identifiées se répartissent entre les deux divisions fongiques *Ascomycètes* et *Basidiomycètes* (**Figure 3.14**). Il y a une majorité d'espèces fongiques appartenant à la division des *Ascomycètes* à la surface des pommes bio par rapport aux pommes conventionnelles où les espèces identifiées appartiennent majoritairement à la division des *Basidiomycètes*. En effet, 23 bandes ADN ont été identifiées comme appartenant à la division des *Ascomycètes* contre 15 pour les *Basidiomycètes* sur les pommes bio. Sur les pommes conventionnelles, les espèces fongiques appartiennent majoritairement à la division des *Basidiomycètes*, avec 21 bandes ADN identifiées comme appartenant à cette division contre 16 *Ascomycètes*.

La **Figure 3.15**. montre que la communauté fongique est plus variée dans la division des *Basidiomycètes* comparé aux *Ascomycètes*. En effet, il est intéressant de noter que les espèces fongiques de la division des *Ascomycètes* se répartissent dans deux classes, les *Dothideomycètes* (la plus représentée, avec au total 38 bandes ADN identifiées comme appartenant à cette classe) et les *Sordariomycètes* (une seule bande ADN). À l'inverse, les espèces fongiques qui font partie de la division des *Basidiomycètes* se répartissent dans 5 classes différentes (*Exobasidiomycètes*, *Tremellomycètes*, *Urediniomycètes*, *Microbotryomycètes* et *Cystobasidiomycètes*). On remarque également que les *Dothideomycètes* sont majoritairement présents sur les pommes bio, avec 23 bandes ADN détectées comme appartenant à cette classe contre 15 dans le cas des pommes conventionnelles. De plus, les *Sordariomycetes* n'ont pas été détectés dans les pommes bio, tout comme les *Cystobasidiomycetes*.

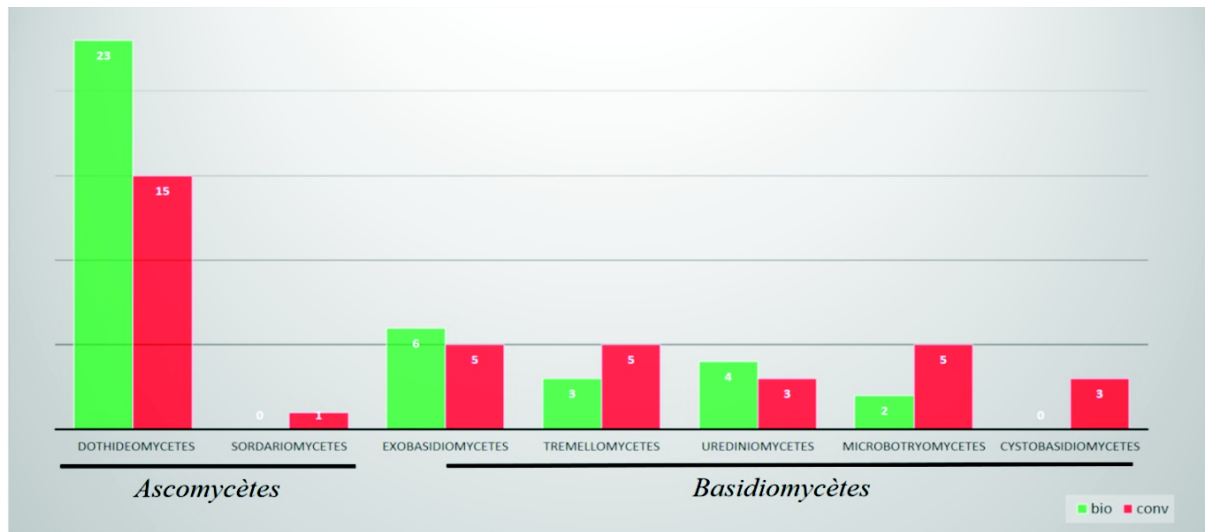


Figure 3.15. Répartition des ADN fongiques identifiés en fonction de leur appartenance à une division (*Ascomycètes* vs *Basidiomycètes*) et à une classe ou à un mode de production (bio vs conv).

*Bio = Biologique *Conv. = Conventionnelle

De nombreux agents pathogènes des plantes, en particulier des fruits et des légumes, font partie de la division des *Ascomycètes* (Berbee, 2001 ; González-Fernández *et al.*, 2010) (Annexe 2). D'ailleurs, les membres de la classe des *Dothideomycetes* sont souvent retrouvés comme pathogènes, endophytes ou épiphytes des plantes (Schoch *et al.*, 2006 ; Ohm *et al.*, 2013). Les traitements fongicides sont donc majoritairement utilisés contre ces derniers. Or les traitements chimiques étant interdits en AB, on peut supposer que les différences observées entre les pommes bio et non bio, au niveau des communautés fongiques appartenant à cette division, seraient dues aux traitements employés pour lutter contre ces pathogènes.

3.3.1.2.2. Identification des espèces bactériennes associées aux pommes

Pour les bactéries, l'identification des bandes récupérées après PCR-DGGE était plus délicate à réaliser que pour les espèces fongiques. En effet, la grande variation inter-fruit avait rendu difficile la sélection des marqueurs ADN/bandes bactériennes d'intérêt. De plus, certaines bandes étaient très intenses et très rapprochées les unes des autres, il était donc possible de retrouver des mélanges de plusieurs séquences dans une bande découpée (cf. Figure 3.16.), empêchant ainsi l'identification par séquençage. Ce type de résultat a été obtenu avec environ la moitié des bandes ADN récupérées à partir des différents gels DGGE.

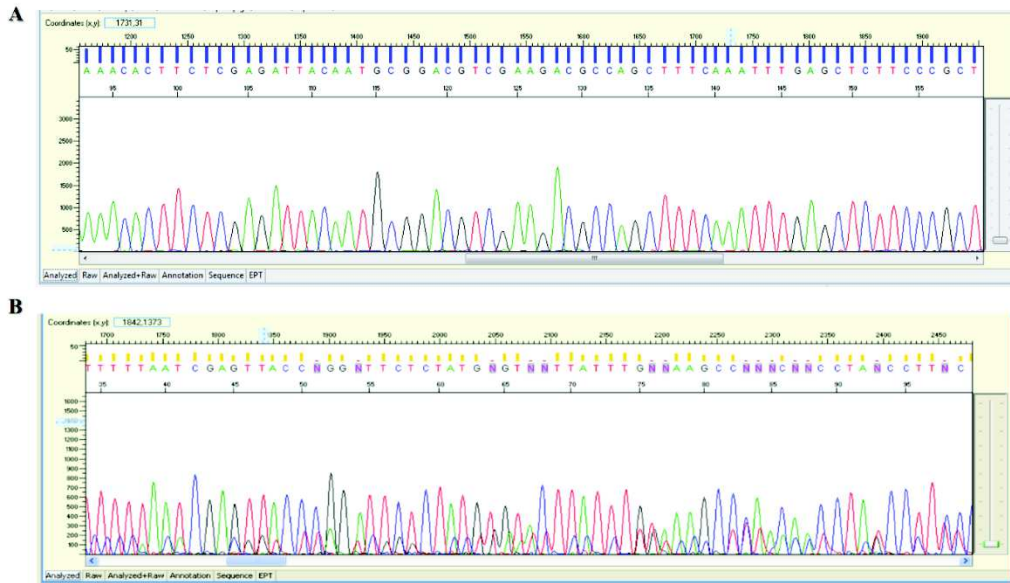


Figure 3.16. Analyse des séquences de bandes ADN bactériennes issues de gels DGGE. Visualisation à l’aide du logiciel Sequence Scanner v1.0 (Free Applied Biosystems Software) **A/** Chromatogramme de bonne qualité, **B/** Mélange de 2 signaux.

Nous avons cependant pu identifier par séquençage, sur l’ensemble des pommes, un total de 28 bandes ADN qui étaient affiliées à 19 taxons bactériens différents. Certaines étaient retrouvées à la fois sur les pommes conventionnelles et sur les pommes bio. La compilation de ces bandes nous a permis de mettre en évidence 5 phyla bactériens (Figure 3.17.).

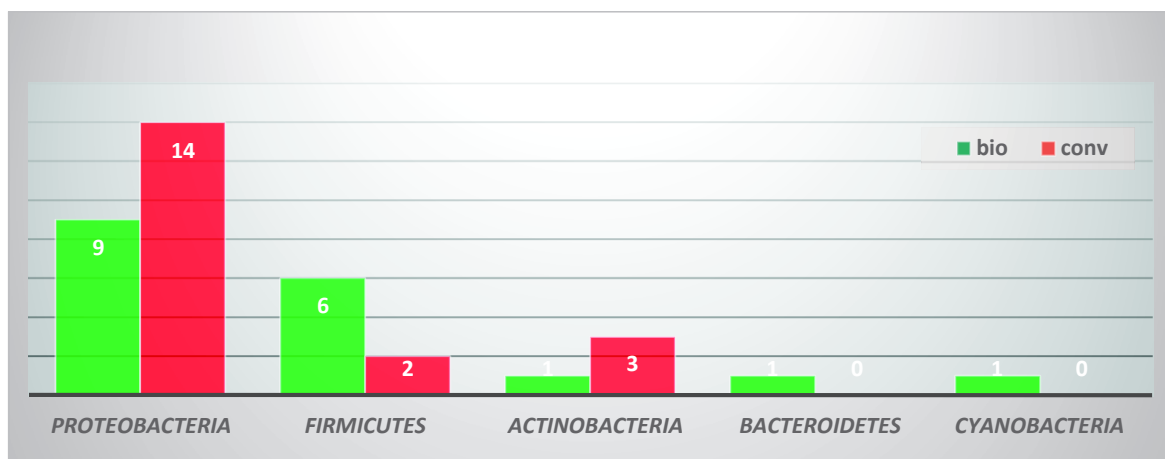


Figure 3.17. Répartition des ADN bactériens identifiés dans les phyla bactériens et les modes de production (bio vs conv).

*Bio = Biologique *Conv. = Conventiionnelle

L'identification des bandes ADN de bactéries montre que les espèces présentes à la surface des pommes appartiennent principalement aux phyla des *Protéobactéries*, des *Firmicutes* et des *Actinobactéries* (**Figure 3.17.**). Les espèces bactériennes appartenant aux deux autres phyla, les *Bactéroidetes* et les *Cyanobactéries*, n'ont été retrouvées que sur les pommes bio. Le phylum des *Bactéroidetes* étant majoritairement composé d'espèces anaérobies, on suppose que la présence de biofilms sur la peau des pommes créerait un environnement anaérobie propice à ces espèces bactériennes.

De plus, la proportion de marqueurs ADN bactériens appartenant aux *Protéobactéries* apparaît plus importante sur les pommes conventionnelles que sur les pommes bio : 14 bandes ADN ont été affiliées à ce phylum pour les pommes conventionnelles, contre 9 dans le cas des pommes bio (**Figure 3.17.**). La même observation peut être faite concernant les *Actinobactéries* où 3 bandes ADN ont été identifiées comme appartenant à ce phylum sur les pommes conventionnelles, contre une seule sur les bio. La tendance inverse est observée pour les *Firmicutes*, avec 4 bandes ADN fongiques présentes sur les pommes bio contre 2 sur les conventionnelles.

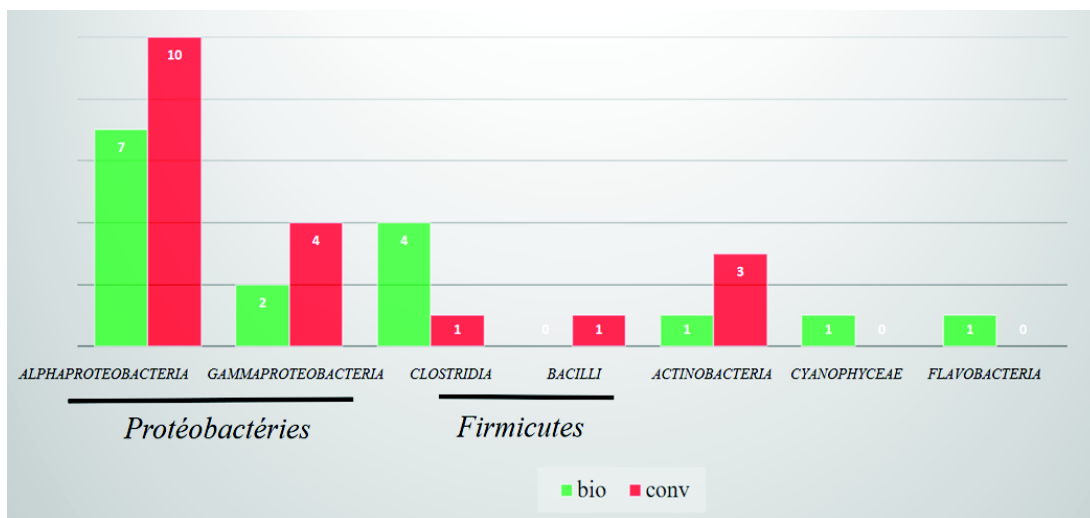


Figure 3.18. Répartition des ADN bactériens dans les taxons et les modes de production (bio vs conv).

*Bio = Biologique *Conv. = Conventiionnelle

La **Figure 3.18.** permet de constater que les bandes ADN de bactéries appartenant au phylum des *Protéobactéries* se répartissent principalement dans les classes des *Alphaprotéobactéries* et des *Gammaprotéobactéries*. Les *Alphaprotéobactéries* étant les plus représentées, sur les pommes bio comme sur les pommes conventionnelles. Dans les deux cas,

ces classes étaient majoritaires sur les pommes conventionnelles (avec 10 *Alphaprotéobactéries* et 4 *Gammaprotéobactéries*, contre 7 *Alphaprotéobactéries* et 2 *Gammaprotéobactéries* dans le cas des pommes bio).

Concernant le phylum des *Firmicutes*, les bandes ADN identifiées étaient réparties dans deux classes : les *Clostridia* (5 bandes ADN) et les *Bacilli* (une bande ADN). Aucun *Bacilli* n'a pas été détectée sur les pommes bio. Par contre, la classe des *Clostridia* était principalement représentée sur ces types de pommes (5 espèces) comparé à celles issues de l'agriculture conventionnelle (une seule espèce).

Malgré la faible quantité de bandes ADN de bactéries qui a été identifiée, les résultats corroborent ceux des études précédemment réalisées sur fruits. En effet, les travaux d'**Ottesen et al. (2009)** et de **Leff et al. (2013)** ont démontré, par séquençage à haut débit de l'ADN bactérien (16S) présents sur des fruits (notamment les pommes), que les communautés bactériennes étaient dominées par des espèces appartenant aux phyla des *Actinobactéries*, *Bactéroidetes*, *Firmicutes* et *Protéobactéries*. Notamment, une plus grande proportion d'espèces bactériennes appartenant au phylum des *Protéobactéries* fut retrouvée sur les pommes issues de l'agriculture conventionnelle. Ces espèces ont également été détectées sur les pommes de notre étude.

Ces différences ne permettent pas de conclure précisément sur la discrimination bio/non bio. Mais elles nous amènent à supposer qu'il faudrait cibler la recherche sur les espèces bactériennes appartenant aux phyla des *Actinobactéries*, des *Firmicutes*, et/ou des *Protéobactéries*.

3.3.1.2.3. Conclusion partielle

Ainsi, les espèces fongiques identifiées ont pu être classées dans 2 taxons différents (les *Ascomycètes* et les *Basidiomycètes*), alors que les espèces bactériennes pouvaient être réparties dans 5 groupes taxonomiques (les *Actinobactéries*, les *Bactéroidetes*, les *Firmicutes*, les *Protéobactéries* et les *Cyanobactéries*). De plus, une plus grande quantité d'espèces microbiennes qui appartiennent à la division des *Ascomycètes* et au phylum des *Protéobactéries* a été identifiée à la surface des pommes bio. D'autres analyses seront nécessaires pour confirmer les phylotypes associés à un mode de production mais, de façon intéressante, nous avons pu constater une corrélation entre nos résultats avec ceux obtenus par

d'autres études de la flore microbienne des fruits (Ottesen *et al.*, 2009 ; Leff *et al.*, 2013). Ces travaux, réalisés sur des fruits bio et conventionnels, soulignaient l'intérêt d'étudier les effets potentiels des différentes pratiques agricoles sur les communautés bactériennes des aliments, auxquelles seront exposés les consommateurs, en se concentrant sur la recherche de bactéries pathogènes. Aucune espèce pathogène pour l'Homme n'avait été détectée durant ces études, tout comme cela a été constaté durant nos travaux de recherche (que ce soit pour les espèces fongiques ou bactériennes). L'identification des microorganismes retrouvés sur nos fruits démontre cependant que certains d'entre eux peuvent altérer la conservation des fruits (*Peltaster*) ou être à l'origine de maladies infectieuses graves. Ils ont été majoritairement retrouvés sur les produits bio (*Erwinia amylovora*³⁰ et *Pseudomonas syringae*³¹) (Kerkoud *et al.*, 2002 ; Ordax *et al.*, 2015). Cela suggère que ces fruits se conserveraient moins bien que leurs homologues conventionnels. La déclaration de l'apparition des symptômes de feu bactérien est obligatoire. Mais comme aucune déclaration n'a été relevée durant notre étude, on peut supposer que les traitements utilisés pour lutter contre la bactérie à l'origine de cette maladie (*Erwinia amylovora*) ont été efficaces et que l'ADN retrouvé était de l'ADN résiduel.

Nous n'avons pas trouvé dans la bibliographie actuelle des études auxquelles il aurait été possible de se référer pour l'identification des marqueurs ADN/espèces fongiques. Mais il semblerait que le groupe des *Ascomycètes* serait le groupe le plus intéressant pour la discrimination des fruits bio des fruits conventionnels.

Nos travaux ont démontré qu'il était possible d'identifier des taxons microbiens qui seraient spécifiques des pommes cultivées selon un type d'agriculture défini. L'abondance et la richesse microbienne ont ensuite été étudiées par qPCR et HRM respectivement afin de savoir si ces facteurs pouvaient être discriminants.

3.3.1.3. Étude de l'abondance microbienne associée aux pommes

Dans le but d'évaluer l'impact du mode de production sur l'abondance microbienne des pommes, les ADN bactériens et fongiques extraits de ces fruits ont été quantifiés par qPCR.

³⁰ Agent phytopathogène à l'origine du feu bactérien du pommier.

³¹ Agent phytopathogène à l'origine de la présence de tâches vésiculaires sur les pommes.

La qPCR est une méthode qui repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus d'amplification par PCR à l'aide de la fluorescence puis de quantifier un ADN cible présent dans un échantillon.

3.3.1.3.1. Charge fongique à la surface des pommes

Afin d'estimer la quantité d'ADN fongiques présents à la surface des pommes, l'amplification de l'ADNr 26S a été suivie de mesures de Ct. Une gamme de dilution (10^{-1} à 10^{-10}) avec un nombre connu de copies d'ADN cible a été utilisée. Pour cela, des plasmides recombinants, contenant la séquence cible (un fragment de l'ADNr 26S de *Saccharomyces cerevisiae*, cf « **Matériels et Méthodes** » et **Annexe 1**), ont été utilisés comme standard pour construire la courbe étalon (**Figure 3.19.**). Une quantification absolue a été réalisée en s'appuyant sur des dilutions du standard dont la concentration était connue, soit $3,79.10^{10}$ copies/ μ L. Le calcul de cette concentration a été réalisé en appliquant la formule suivante :

$$\frac{\text{Concentration de l'ADN total (g/}\mu\text{L)} \times N}{(\text{Taille du plasmide} + \text{taille du fragment d'ADN}) \times 660}$$

$$1\text{pb} = 660 \text{ g/mol}$$

$$\text{Taille du fragment d'ADNr 26S (S. cerevisiae)} = 247 \text{ pb}$$

$$\text{Taille du plasmide (pUC57)} = 2710 \text{ pb}$$

$$\text{Nombre d'Avogadro (N)} = 6,02.10^{23}$$

$$\text{Concentration ADN total (plasmides recombinants)} = 122,75 \text{ ng/}\mu\text{L}$$

Des dilutions de cette gamme étalon ont été déposées sur chaque plaque réalisée durant ces travaux de thèse, permettant ainsi de standardiser les mesures.

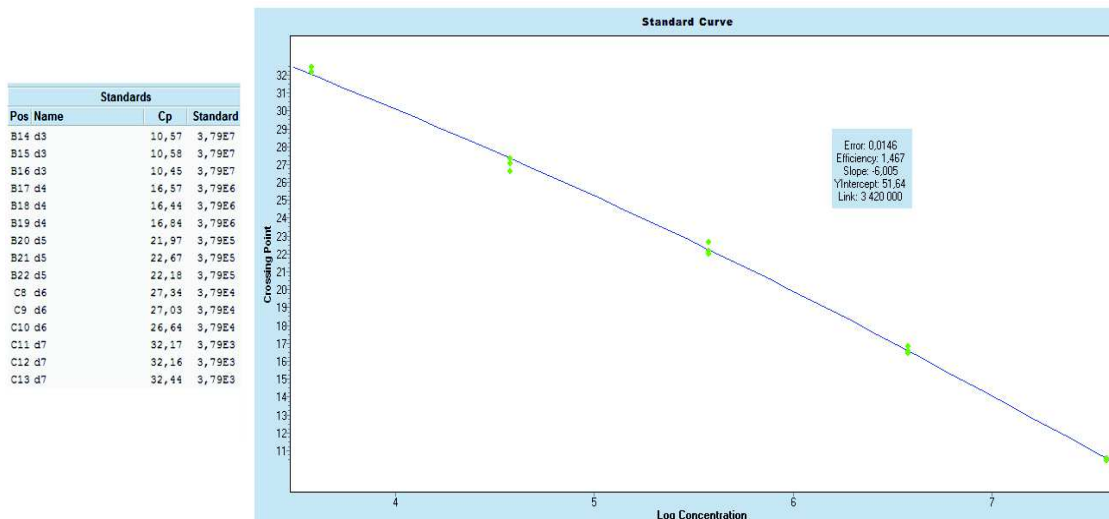


Figure 3.19. Courbe d'étalonnage d'ADN fongique (ADNr 26S de *S. cerevisiae*).

La concentration absolue du gène cible a été déterminée pour chacun des échantillons de pommes en se référant à ce standard. La moyenne des concentrations obtenues pour l'ensemble des échantillons a ensuite été calculée selon les modes de production, les localisations dans une même parcelle, l'année d'échantillonnage, mais aussi pour les pommes bio récoltées en 2014 et provenant d'une deuxième parcelle. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 3.20**.

D'un point de vue général, les charges fongiques à la surface des pommes étaient de l'ordre de 10^6 à 10^7 copies/ μ L. Le graphique de la **Figure 3.20** permet de constater que la charge fongique est plus importante à la surface des pommes bio par rapport aux pommes conventionnelles, quelle que soit l'année d'échantillonnage ou la position du fruit dans la parcelle. En effet, les pommes de 2013 ont une charge fongique moyenne de $6,81E+06$ copies/ μ L pour les bio et de $3,07E+06$ copies/ μ L pour les conventionnelles. Les pommes de 2014 avaient des charges fongiques plus élevées, avec en moyenne $1,14E+07$ copies/ μ L retrouvées sur les pommes bio contre $7,21E+06$ copies/ μ L sur les conventionnelles.

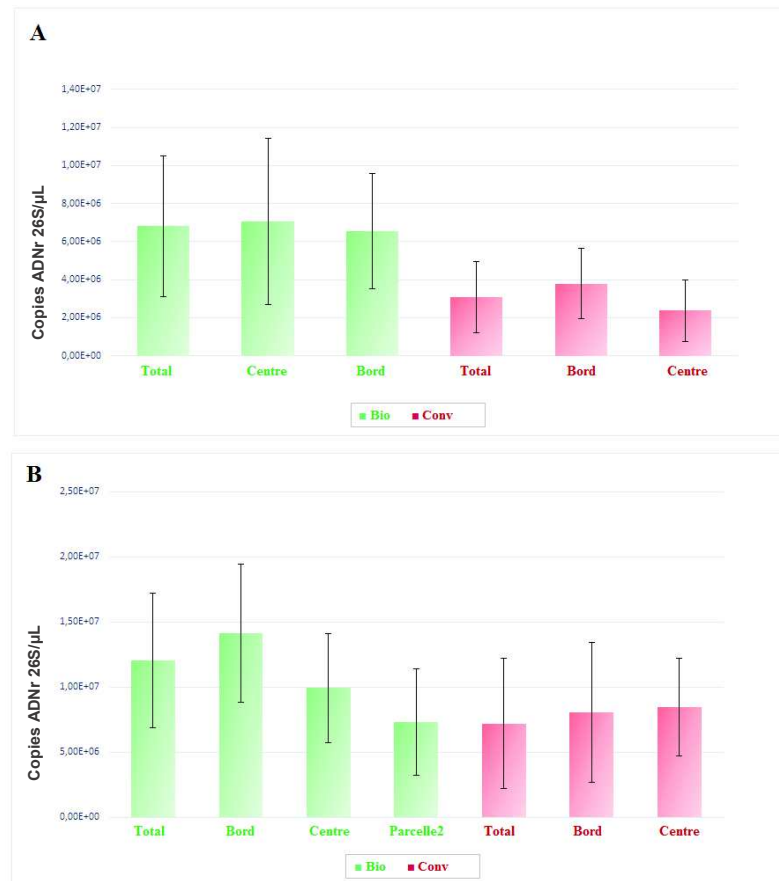


Figure 3.20. Charge fongique estimée par qPCR sur ADN 26S des pommes échantillonnées en 2013 (A) et en 2014 (B) à différentes positions dans les parcelles biologiques (« Bio ») et conventionnelles (« Conv »).

« **Parcelle2** » correspond aux échantillons qui proviennent d'une autre parcelle biologique, échantillonnés en 2014 également. « **Total** » = sans prendre en compte « **Parcelle2** ».

Des analyses statistiques par analyse de variance ont été entreprises sur les résultats des analyses de qPCR. L'hypothèse d'homoscédasticité a tout d'abord été testée. Cette analyse permet de vérifier si les variances des variables examinées sont constantes. Dans notre cas, la variance des échantillons n'était pas homogène et les données ne suivaient pas une loi normale (test de Shapiro-Wilk : $p < 0,05$). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la charge fongique pouvait varier d'une pomme à une autre quel que soit le mode de production, justifiant également les écart-types élevés observés (**Figure 3.20.**). La transformation de la variable réponse, pour équilibrer les variances, a donné les mêmes résultats, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a donc été appliqué. Si ce test est moins puissant qu'une ANOVA traditionnelle, il s'adapte plus facilement aux échantillons qui ne suivent pas une loi normale. L'hypothèse nulle H_0 (« les échantillons proviennent de la même population ») et l'hypothèse alternative H_a (« les échantillons proviennent de populations différentes ») ont été posées et le risque d'erreur a été fixé ($\alpha = 0,05$). Les résultats obtenus nous ont conduit à

rejeter l’hypothèse nulle H_0 , et donc de déduire que la charge fongique est différente selon le type de pomme (bio/non bio, 2013/2014...). À la suite du test de Kruskal-Wallis, nous avons effectué un test post-hoc de comparaison multiple par paire de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, avec un intervalle de confiance de 95 %, pour déterminer les échantillons qui présentent des différences. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l’aide du logiciel XLSTAT version 2014. Recommandé par **Hollander et Wolfe (1999)**, ce test nécessite le recalcul des rangs pour chaque combinaison deux à deux des échantillons. Le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner a fait ressortir trois groupes principaux (**Tableau 3.6.**) : les pommes conventionnelles 2013 (groupe A), les pommes bio 2013 et conventionnelles 2014 (groupe B) et les pommes bio 2014 (groupe C).

Tableau 3.6. Résultats de la comparaison multiple de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisée à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

| Échantillon | Effectif | Somme des rangs | Moyenne des rangs | Groupes |
|-------------|----------|-----------------|-------------------|---------|
| Conv* 2013 | 30 | 832,50 | 27,75 | A |
| Bio* 2013 | 30 | 1830,00 | 61,00 | B |
| Conv 2014 | 30 | 1849,50 | 61,65 | B |
| Bio 2014 | 30 | 2748,00 | 91,60 | C |

*Conv = Conventionnel *Bio = Biologique

Ce test démontre qu’il y a non seulement un effet des traitements sur la charge fongique mais également un effet de l’année de récolte qui semble d’ailleurs entraîner plus de variations puisqu’il n’est pas possible de dissocier les pommes bio de 2013 des conventionnelles de 2014. Par contre, si l’on compare les fruits de la même année, on constate qu’il y a une discrimination des pommes bio. Le tableau ci-dessous montre que cette différence observée est significative. Le codage « oui » indique en effet qu’il existe une différence significative entre les échantillons testés deux à deux : le degré de signification auquel l’hypothèse nulle de similitude entre les échantillons est rejetée était inférieur à 0,05.

Tableau 3.7. Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

| | Bio 2013 | Conv 2013 | Bio 2014 | Conv 2014 |
|------------|----------|-----------|----------|-----------|
| Bio* 2013 | - | Oui | Oui | Non |
| Conv* 2013 | Oui | - | Oui | Oui |
| Bio 2014 | Oui | Oui | - | Oui |
| Conv 2014 | Non | Oui | Oui | - |

*Bio = Biologique *Conv = Conventionnel

Il a été déduit de la **Figure 3.20.** que les pommes bio de 2014 ont une charge fongique plus importante (groupe C) que les pommes conventionnelles de 2013 (groupe A). Les autres types de pommes sont donc intermédiaires au niveau de la charge fongique présente sur la peau. Les ratios obtenus avec les moyennes des pommes montrent que les pommes bio ont une charge fongique, entre 1,5 et 2 fois, supérieure aux pommes conventionnelles (**Tableau 3.8.**). Les tests statistiques précédemment décrits prouvent que cette différence est significative mais qu'il n'est pas possible de différencier les pommes bio des conventionnelles indépendamment de leur année de production du fait que l'année d'échantillonnage entraîne des variations non négligeables au niveau de la charge fongique des fruits. Ce qui n'était pas le cas qualitativement avec les gels DGGE. Cela signifie que, dans le cadre de la mise en place d'un outil d'authentification, il serait nécessaire de refaire les analyses chaque année pour effectuer la discrimination par la quantification globale de la flore microbienne des pommes. La recherche de marqueurs microbiens (ou groupe de marqueurs) spécifiques peut donc être pertinente.

Tableau 3.8. Comparaison des charges fongiques (en nombre de copies du gène 26S/μL) obtenues sur les pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014).

| Année | Agriculture | Moyenne | Écart-type | Ratio Bio/Conv |
|-------|-------------|----------|------------|----------------|
| 2013 | Bio* | 6,81E+06 | 3,71E+06 | 2,22 |
| | Conv* | 3,07E+06 | 1,86E+06 | |
| 2014 | Bio | 1,14E+07 | 5,24E+06 | 1,58 |
| | Conv | 7,21E+06 | 4,99E+06 | |

*Bio = Biologique *Conv = Conventionnel

3.3.1.3.2. Charge bactérienne à la surface des pommes

Afin d'estimer la quantité d'ADN bactériens présents à la surface des pommes, l'amplification de l'ADNr 16S a été suivie de mesures de Ct. Une gamme de dilution (10^{-1} à 10^{-10}) avec un nombre connu de copies d'ADN cible a été utilisée. Pour cela, des plasmides recombinants, contenant la séquence cible (un fragment de l'ADNr 16S d'*Escherichia coli*, cf « **Matériels et Méthodes** » et **Annexe 1**), ont été utilisés comme standard pour construire la courbe étalon. Une quantification absolue a été réalisée en s'appuyant sur des dilutions du standard dont la concentration était connue, soit $3,72 \cdot 10^{10}$ copies/ μL (**Figure 3.21**). Le calcul de cette concentration a été réalisé avec la même formule que celle appliquée précédemment pour l'étude de la charge fongique. Les données utilisées étant les suivantes :

$$l_{pb} = 660 \text{ g/mol}$$

$$\text{Taille du fragment d'ADNr 16S (E. coli)} = 197 \text{ pb}$$

$$\text{Taille du plasmide (pUC57)} = 2710 \text{ pb}$$

$$\text{Nombre d'Avogadro (N)} = 6,02 \cdot 10^{23}$$

$$\text{Concentration ADN total (plasmides recombinants)} = 118,66 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Des dilutions de cette gamme étalon ont été déposées sur chaque plaque réalisée durant ces travaux de thèse, permettant ainsi de standardiser les mesures.

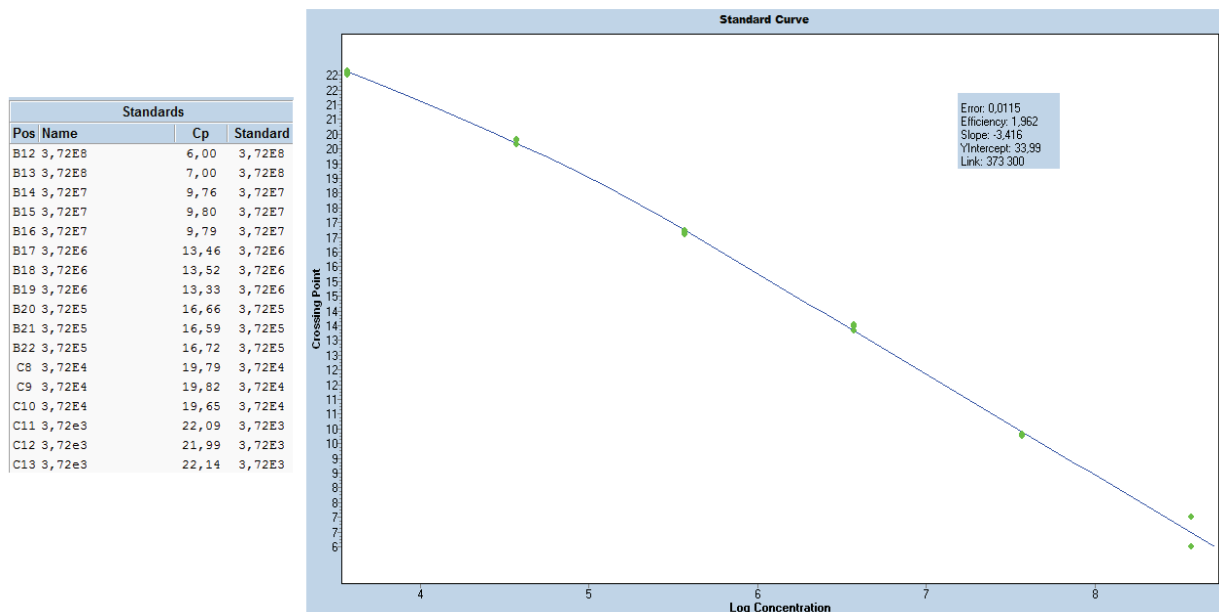


Figure 3.21. Courbe d'étalonnage d'ADN bactérien (ADNr 16S d'*E. coli*).

La concentration absolue du gène cible a été déterminée pour chacun des échantillons de pommes en se référant à ce standard afin de pouvoir comparer la quantité d'ADNr 16S présente à la surface des pommes bio par rapport aux pommes conventionnelles. La moyenne des concentrations obtenues pour l'ensemble des échantillons a ensuite été calculée et comparée pour les modes de production, les localisations dans une même parcelle, l'année d'échantillonnage, mais aussi pour les pommes bio récoltées en 2014 et provenant d'une deuxième parcelle. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 3.22**.

D'un point de vue général, les charges bactériennes étaient, sur l'ensemble des pommes étudiées, de l'ordre de 10^5 à 10^6 copies/ μL . Le graphique de la **Figure 3.22** montre que la charge bactérienne est plus importante à la surface des pommes de 2013 par rapport à celles qui ont été récoltées en 2014. En effet, les pommes de 2013 ont une charge bactérienne moyenne de $3,04\text{E}+06$ copies/ μL , alors qu'en moyenne $9,92\text{E}+05$ copies/ μL sont retrouvées sur les pommes de 2014. De plus, les pommes bio de 2013 ont une charge bactérienne plus importante par rapport aux pommes conventionnelles (respectivement $3,82\text{E}+06$ copies/ μL et $2,25\text{E}+06$ copies/ μL), alors que la tendance s'inverse sur les pommes de l'échantillonnage de l'année suivante ($6,87\text{E}+05$ copies/ μL sur les bio et $1,30\text{E}+06$ copies/ μL sur les conventionnelles).

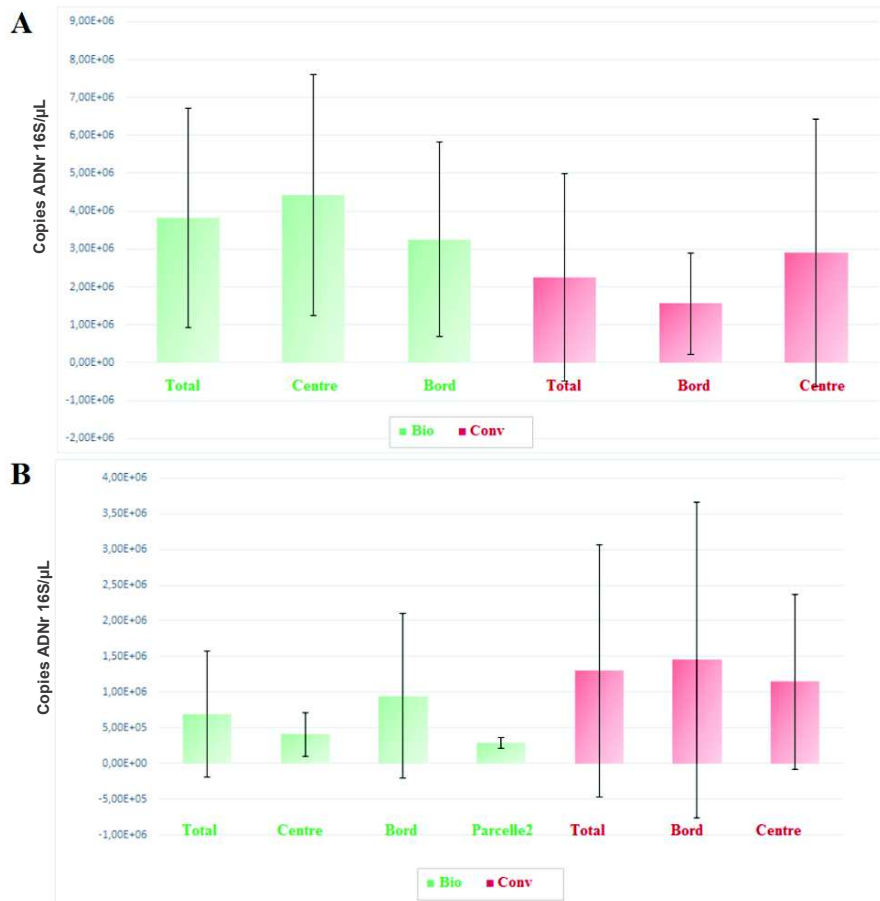


Figure 3.22. Charge bactérienne estimée par qPCR sur l'ADNr 16S des pommes échantillonnées en 2013 (A) et en 2014 (B) à différentes positions dans les parcelles biologiques (« Bio ») et conventionnelles (« Conv »).

« **Parcelle 2** » correspond aux échantillons qui proviennent d'une autre parcelle biologique et échantillonnées en 2014 également. « **Total** » = sans prendre en compte « **Parcelle 2** ».

De très grandes variations ont été obtenues pour la charge bactérienne mesurée d'une pomme à une autre. La **Figure 3.22.** l'illustre bien : les écart-types sont très élevés pour les différents histogrammes. Par exemple, l'histogramme représentant la charge bactérienne des pommes conventionnelles prélevées au bord de la parcelle en 2014 (**Figure 3.22.B**) présente un écart type qui dépasse la valeur moyenne obtenue du nombre de copies du gène 16S/μL. Les concentrations d'ADNr 16S qu'il était possible de retrouver à la surface des pommes pouvaient varier d'un facteur 10^3 à un facteur 10^6 copies/μL, en particulier pour les pommes de 2014. Ces différences élevées expliquent les écart-types obtenus.

La même démarche que celle qui a été appliquée pour l'étude de la charge fongique a ensuite été appliquée pour interpréter statistiquement les résultats. Il a également été constaté que la variance des échantillons n'était pas homogène et que les données ne suivaient pas une

loi normale (test de Shapiro-Wilk : $p < 0,05$). Ce qui était prévisible au vu des résultats obtenus au niveau de la charge bactérienne et des écart-types illustrés dans la **Figure 3.22**. La transformation de la variable réponse, pour équilibrer les variances, ayant donné les mêmes résultats, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a donc été appliqué comme décrit précédemment : les tests d’hypothèses nous ont amené à rejeter l’hypothèse nulle H_0 (« les échantillons proviennent de la même population ») et à retenir l’hypothèse alternative H_a (« les échantillons proviennent de populations différentes ») avec un risque d’erreur fixé à $\alpha = 0,05$. Le test de comparaison multiple post-hoc par paire de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner a ensuite été appliqué, avec un intervalle de confiance de 95%, pour déterminer quels sont les échantillons qui présentent des différences. Le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner nous a fait ressortir trois groupes principaux (**Tableau 3.9.**) : les pommes bio 2014 (groupe A), les pommes conventionnelles 2013 (groupe B), les pommes bio 2013 (groupe C) et les pommes conventionnelles 2014 qui pourraient être aussi bien classées dans le groupe des pommes bio de 2014 qu’avec celui des pommes conventionnelles de 2013.

Tableau 3.9. Résultats de la comparaison multiple de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisée à partir des données obtenues par qPCR sur ADN bactériens (16S).

| Échantillon | Effectif | Somme des rangs | Moyenne des rangs | Groupes | |
|-------------|----------|-----------------|-------------------|---------|---|
| Bio* 2014 | 30 | 1150,00 | 38,33 | A | |
| Conv* 2014 | 30 | 1493,50 | 49,78 | A | B |
| Conv 2013 | 30 | 1944,50 | 64,82 | | B |
| Bio 2013 | 30 | 2672,00 | 89,07 | | C |

*Bio = Biologique *Conv = Conventionnel

Ce test démontre qu’il y a non seulement un effet des traitements sur la charge bactérienne mais aussi un effet de l’année de récolte. En outre, la charge bactérienne variait de façon importante d’une pomme à une autre, à tel point qu’il n’a pas été possible de classer les pommes conventionnelles de 2014 entre les groupes A et B. Le tableau ci-dessous montre que cette différence observée est significative. Le codage « oui » indique qu’il existe une différence significative entre les échantillons testés deux à deux (le degré de signification était inférieur à 0,05).

Tableau 3.10. Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN bactériens (16S).

| | Bio 2013 | Conv 2013 | Bio 2014 | Conv 2014 |
|------------|----------|-----------|----------|-----------|
| Bio* 2013 | - | Oui | Oui | Oui |
| Conv* 2013 | Oui | - | Oui | Non |
| Bio 2014 | Oui | Oui | - | Non |
| Conv 2014 | Oui | Non | Non | - |

*Bio = Biologique *Conv = Conventionnel

On constate que les différences observées d’une année sur l’autre sont statistiquement significatives : en 2013 les pommes bio présentaient une plus grande charge bactérienne (1,69 fois plus) que les pommes conventionnelles, alors qu’en 2014 l’inverse est observé (1,89 fois plus de bactéries sur les fruits conv) (**Tableau 3.11.**).

Tableau 3.11. Comparaison des charges bactériennes (en nombre de copies du gène 16S/μL) obtenues sur les pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014) par qPCR.

| Année | Agriculture | Moyenne | Écart-type | Ratios |
|-------|-------------|----------|------------|-----------------|
| 2013 | Bio* | 3,82E+06 | 2,89E+06 | Bio/Conv = 1,69 |
| | Conv* | 2,25E+06 | 2,74E+06 | |
| 2014 | Bio | 6,87E+05 | 8,84E+05 | Conv/Bio = 1,89 |
| | Conv | 1,30E+06 | 3,03E+05 | |

*Bio = Biologique *Conv = Conventionnel

Les tests statistiques précédemment décrits prouvent que, d’un point de vue général, les différences observées ne sont pas suffisantes pour pouvoir réaliser une discrimination des pommes bio de 2014 sur la seule base de l’analyse de leur charge bactérienne. En corrélant ces analyses quantitatives avec ce qui avait été obtenu avec l’étude des profils DGGE, on peut souligner l’importance de sélectionner des groupes bactériens (correspondants aux VIP dans les profils génétiques obtenus après DGGE) pour la discrimination afin de réduire le biais entraîné par les variations observées au niveau de la flore bactérienne. La sélection d’espèces bactériennes discriminantes a en effet prouvé que la différenciation des pommes en fonction de leur mode de production était possible et plus significative qu’avec l’analyse globale de la flore bactérienne. Nous supposons donc qu’il serait possible de discriminer quantitativement les pommes bio des autres types de pommes en étudiant ces groupes microbiens.

3.3.1.3.3. Conclusion partielle

Ce travail a permis d'apporter des connaissances au niveau de l'abondance microbienne présente à la surface des pommes selon si elles étaient produites en AB ou en agriculture conventionnelle. D'un point de vue général, les résultats obtenus après qPCR nous ont démontré que la charge fongique était supérieure sur les pommes bio par rapport aux pommes conventionnelles et que les traitements appliqués expliqueraient ce constat : les fongicides chimiques employés en agriculture conventionnelle induiraient une perte au niveau de la flore fongique naturelle présente sur les fruits, comparé à ce qui est retrouvé sur ceux provenant de l'AB. Concernant la flore bactérienne, les résultats obtenus après qPCR confirment ce qui a été obtenu après PCR-DGGE : cette flore présente une très grande variabilité (au niveau de la charge) et justifie la sélection de groupes bactériens pour pouvoir réaliser la discrimination.

De plus, en comparant les charges microbiennes globales de l'ensemble des pommes, il a également été constaté que la flore fongique était plus abondante que la flore bactérienne (charge fongique 3 fois plus élevée que la charge bactérienne). Et ce malgré le fait que les traitements antifongiques soient plus importants que les traitements bactéricides.

Pour compléter les analyses et s'approcher du nombre réel de microorganismes présents à la surface des pommes, il serait important de réaliser une comparaison du nombre de copies/ μL avec un nombre de microorganismes (exprimé en UFC/grammes de peau par exemple). Mais cela nécessiterait de connaître le nombre de copies de chaque gène ribosomique par génome, nombre variant et pas toujours connu selon les espèces, et l'application de méthodes microbiologiques traditionnelles qui favoriseraient l'étude de microorganismes viables et cultivables. On prendrait alors le risque de perdre de l'information sur les espèces microbiennes discriminantes qui ne seraient pas analysables par ces méthodes.

3.3.1.4. Étude de la richesse microbienne associée aux pommes

La méthode HRM (High Resolution Melting) permet d'analyser la cinétique de fusion à haute résolution de l'ADN pour l'étude de la diversité des communautés microbiennes par l'identification de variations dans les séquences d'acides nucléiques. Le principe de cette technique repose sur la capacité de l'ADN double brin à se dénaturer dans des conditions d'augmentation de la température. La signature lumineuse sera donc spécifique à des mélanges d'espèces microbiennes. Cette courbe de fusion sera également dépendante de la

taille de la séquence ADN car elle peut contenir plusieurs domaines de fusion. C'est pourquoi nous avons réalisé la HRM avec les mêmes amorces que celles employées pour la qPCR et la PCR-DGGE. Cela nous permet également de compléter les résultats obtenus entre les différentes approches employées pour l'étude des communautés microbiennes présentes à la surface des pommes bio et conventionnelles. Nous espérons pouvoir faire ressortir des empreintes moléculaires HRM spécifiques du bio car cet outil permet d'effectuer des analyses avec une plus grande rapidité et un coût moins onéreux que la PCR-DGGE (10 fois moins cher que la PCR-DGGE) (**Wittwer, 2009**). En effet, la HRM permet l'analyse de la variation génétique d'un grand nombre d'échantillons simultanément sans nécessité de procéder au séquençage et ne requiert pas l'utilisation de réactifs chimiques dangereux.

Cette approche post-PCR a été appliquée sur nos échantillons afin de comparer les profils HRM obtenus selon le mode de production, à l'image de la PCR-DGGE. Pour cela, nous avons inclus dans le programme de qPCR une étape de dénaturation progressive allant de 40° à 95°C. Les amplicons sont donc dénaturés peu à peu en fonction de leur domaine de fusion (T_m). Chaque séquence d'ADN particulière possède donc une signature lumineuse qui lui est propre, représentée par une courbe de fusion (**Figure 3.23. et 3.24.**) obtenue en représentant la fluorescence en fonction du T_m . Les courbes de fusion obtenues ont tout d'abord été normalisées puis les différences au niveau de la forme de ces courbes et les résultats des T_m ont été comparés.

3.3.1.4.1. Courbes de fusion obtenues pour l'analyse de la richesse fongique (HRM)

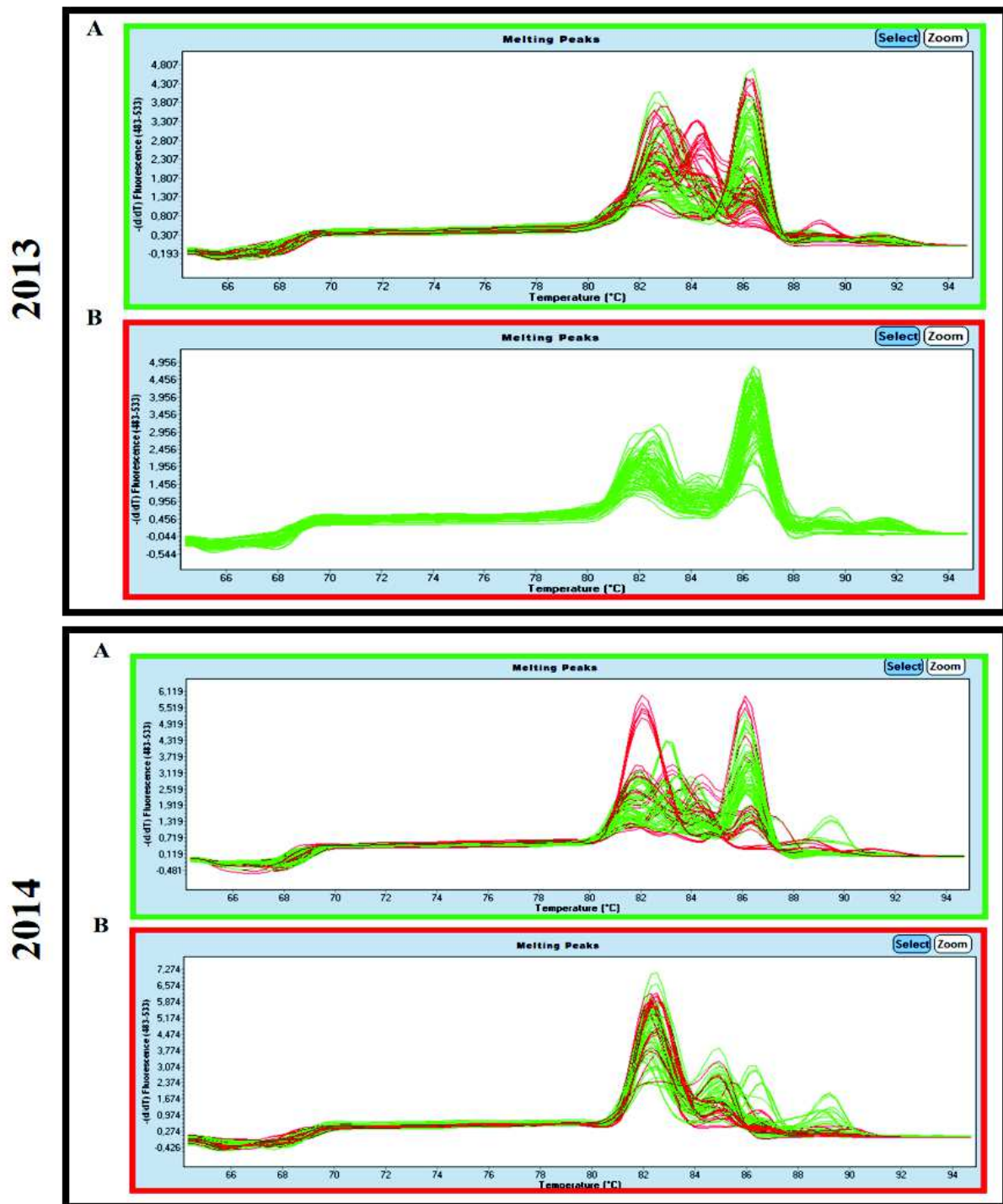


Figure 3.23. Courbes de fusion obtenues par HRM pour l'analyse de la richesse fongique présente à la surface de (A) pommes biologiques et (B) conventionnelles récoltées en 2013 et en 2014.

La couleur des courbes a été attribuée aléatoirement par le logiciel LightCycler® 480 (version 1.5.0 SP4).

L'allure générale des courbes de fusion obtenues pour l'ensemble de nos échantillons (**Figure 3.23.**) indique la présence de deux pics principaux (à $T_{m1} = 83^{\circ}\text{C}$ et $T_{m2} = 86^{\circ}\text{C}$ en moyenne), bien que le deuxième soit moins intense pour les pommes conventionnelles de 2014 (**Figure 3.23.B**). D'autres pics minoritaires sont également distinguables mais il n'a pas été possible d'extraire les données, le logiciel permettait de récupérer uniquement les T_m des deux pics principaux (**Tableau 3.12**).

Tableau 3.12. Comparaison des températures de fusion obtenues pour l'étude globale des populations fongiques de pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014) par qPCR/HRM.

| Année | Agriculture | Moyenne T_m | | Écart-type | |
|-------|-------------|---------------|----------|------------|----------|
| | | T_{m1} | T_{m2} | T_{m1} | T_{m2} |
| 2013 | Bio* | 82,99 | 86,52 | 0,90 | 0,42 |
| | Conv* | 82,72 | 86,45 | 1,40 | 0,11 |
| 2014 | Bio | 82,99 | 86,24 | 1,19 | 0,36 |
| | Conv | 84,38 | 85,61 | 0,22 | 0,90 |

*Bio = Biologique *Conv = Conventionnel

Il aurait été intéressant d'avoir la possibilité d'étudier les courbes dans leur globalité pour faire ressortir les différences au niveau des profils obtenus. En effet, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, appliqué sur l'ensemble des données T_m des différents échantillons, n'a relevé aucune différence significative. Que ce soit en fonction du mode de production, de la position des fruits dans la parcelle ou de leur année de récolte. Pourtant, les profils HRM, et donc les populations fongiques présentent sur les pommes, semblent être différents selon si elles sont bio ou conventionnelles. En effet, lorsque l'on compare l'allure des courbes de fusion obtenues pour les fruits bio des deux années d'échantillonnage, on constate que ces profils sont très proches contrairement aux pommes conventionnelles. Pour rappel, les pommes conventionnelles de 2014 ont été récoltées sur une autre parcelle que celles de 2013 ce qui pourrait expliquer les différences que l'on peut observer. Le premier pic (T_{m1}) est moins intense pour les pommes conventionnelles 2013 comparé à celles qui ont été cultivées en 2014 alors que l'on constate l'inverse pour le T_{m2} .

Si on ramène ces observations à la dimension des populations fongique, on peut supposer que les deux pics principaux correspondraient aux deux divisions majoritaires retrouvées après séquençage des bandes ADN (identifiées par DGGE), les *Ascomycètes* et les *Basidiomycètes*, et semblent être toujours présents dans les deux types de pommes. Avec probablement une correspondance entre Tm1 et le groupe des espèces fongiques appartenant à la division des *Basidiomycètes*, et entre Tm2 et le groupe des espèces fongiques appartenant à la division des *Ascomycètes*. En effet, les *Ascomycètes* seraient plus riches en GC au niveau de la portion de la séquence du gène 26S amplifiée avec les amorces NL1 et LS2 : il a été constaté que les bandes ADN identifiées par PCR-DGGE possédaient un pourcentage en GC supérieur à 50% pour les *Ascomycètes* et inférieur à 50% pour les *Basidiomycètes*. En outre, il a été constaté que les bandes ADN identifiées comme étant des espèces appartenant à la division des *Basidiomycètes* avaient moins migré dans le gel DGGE comparé aux bandes ADN appartenant à l'autre phylum.

3.3.1.4.2. Courbes de fusion obtenues pour l'analyse de la richesse bactérienne (HRM)

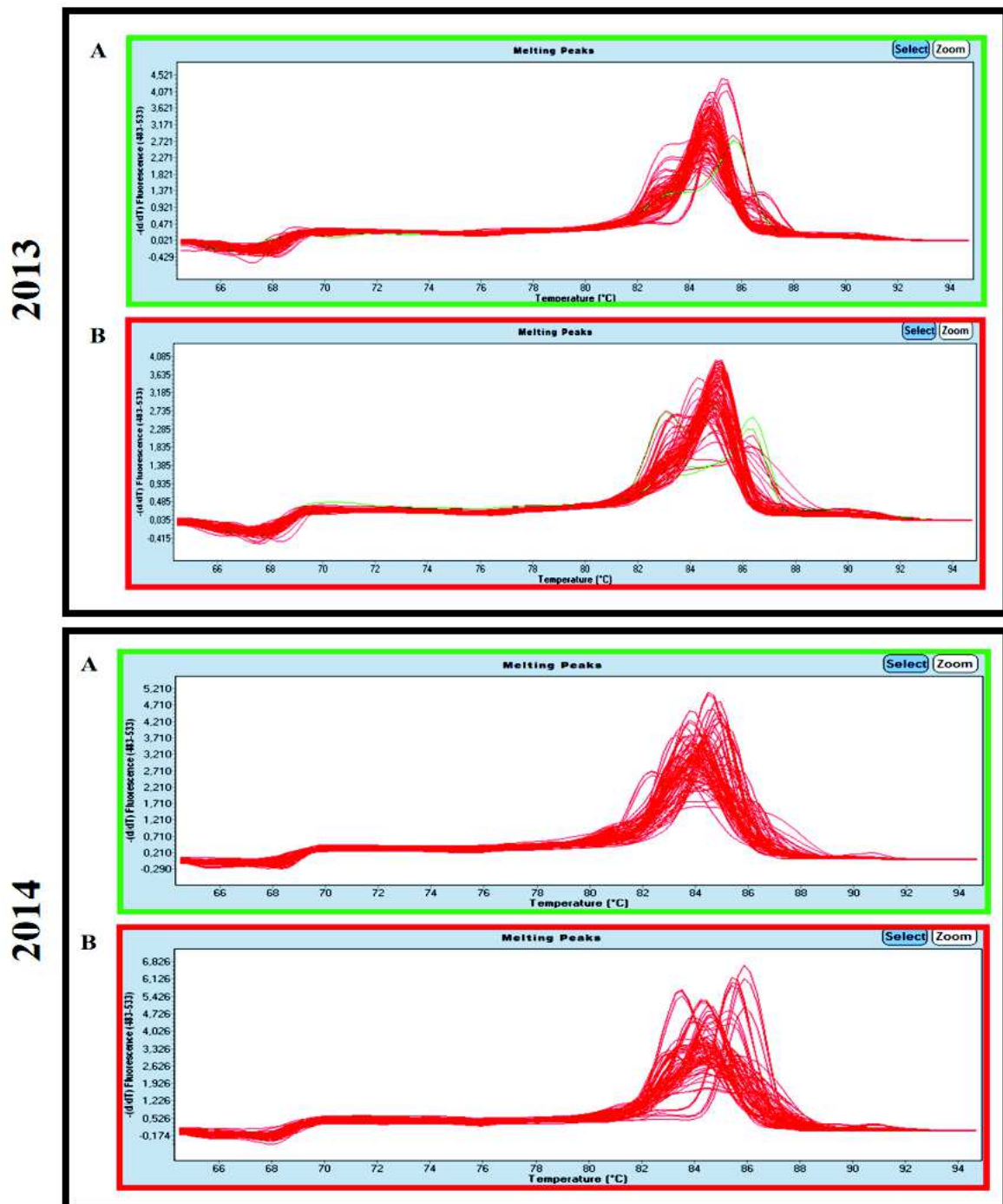


Figure 3.24. Courbes de fusion obtenues par HRM pour l'analyse de la richesse bactérienne présente à la surface de (A) pommes biologiques et (B) conventionnelles récoltées en 2013 et en 2014.

La couleur des courbes a été attribuée aléatoirement par le logiciel LightCycler® 480 (version 1.5.0 SP4).

L'allure générale des courbes de fusion obtenues pour l'ensemble de nos échantillons (**Figure 3.24.**) indique la présence d'un pic principal dont le T_m est en moyenne égale à 84°C (**Tableau 3.13.**). Les autres pics dont les T_m étaient plus élevées ont été retirés de l'analyse (3 échantillons) car ils entraînaient des biais dans l'interprétation statistique. On constate également que l'allure des courbes de fusion est visuellement différente entre les pommes de 2013 et celles de 2014.

Tableau 3.13. Comparaison des températures de fusion obtenues pour l'étude globale des populations bactériennes de pommes bio et conventionnelles (récoltées en 2013 et 2014) par qPCR/HRM.

| Année | Agriculture | Moyenne | Écart-type |
|-------|-------------|---------|------------|
| 2013 | Bio* | 85,28 | 0,34 |
| | Conv* | 85,27 | 0,38 |
| 2014 | Bio | 84,22 | 0,36 |
| | Conv | 84,54 | 0,51 |

*Conv = Conventionnel *Bio = Biologique

Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a également été appliqué sur l'ensemble des données HRM et aucune différence significative n'a été obtenue entre les échantillons, que ce soit en fonction de leur mode de production ou de leur position dans la parcelle. Par contre l'année de récolte semble avoir un impact sur la composition des populations bactériennes. Le test de comparaison multiple post-hoc par paire de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner, appliqué avec un intervalle de confiance de 95%, a en effet fait ressortir deux groupes principaux : les pommes 2014 et les pommes 2013. Mais au vu des données numériques obtenues (**Tableau 3.13.**), on constate que les différences ne se jouent qu'à 1°C . Il n'est pas certain que cela soit significatif biologiquement, il faudrait avoir une meilleure connaissance des populations bactériennes présentes sur les pommes pour le vérifier.

À l'inverse des pics de fusion obtenus pour les communautés fongiques des mêmes fruits, aucune différence visuelle n'est distinguable. L'allure des courbes est en effet similaire pour l'ensemble des échantillons. En corrélant ce résultat avec les séquences ADN identifiées après PCR-DGGE, on peut supposer que le groupe des *Protéobactéries* contribuerait majoritairement au signal. En effet, la majorité des bandes ADN séquencées a été identifiée comme appartenant aux *Protéobactéries*. Mais cela reste à vérifier, tout comme les résultats obtenus pour les populations fongiques.

3.3.1.4.3. Conclusion partielle

À l'image de la méthode DGGE, la méthode HRM nous a donc permis d'obtenir des profils génétiques microbiens spécifiques d'un échantillon donné. Nous avons en effet pu constater que, tout comme les profils DGGE, les profils fongiques obtenus par HRM étaient plus riches pour les pommes bio que les non bio (**Figure 3.25.**) Autrement dit, un plus grand nombre de bandes ADN étaient retrouvées dans les profils fongiques DGGE des échantillons bio et plus de variation au niveau de l'allure des courbes pour les profils HRM. Les profils bactériens, HRM et DGGE, ont permis de visualiser une différence en fonction du mode de production, mais ces différences n'ont pu être validées statistiquement. En effet, pour pouvoir discriminer les profils DGGE bactériens, des analyses statistiques plus poussées ont dû être appliquées à partir des données qu'il était possible d'extraire des gels DGGE (nombre de bandes ADN et leur intensité). Les données HRM qu'il était possible d'extraire étaient insuffisantes pour réaliser une étude comparative plus fine que par la seule interprétation des valeurs de Tm obtenues.

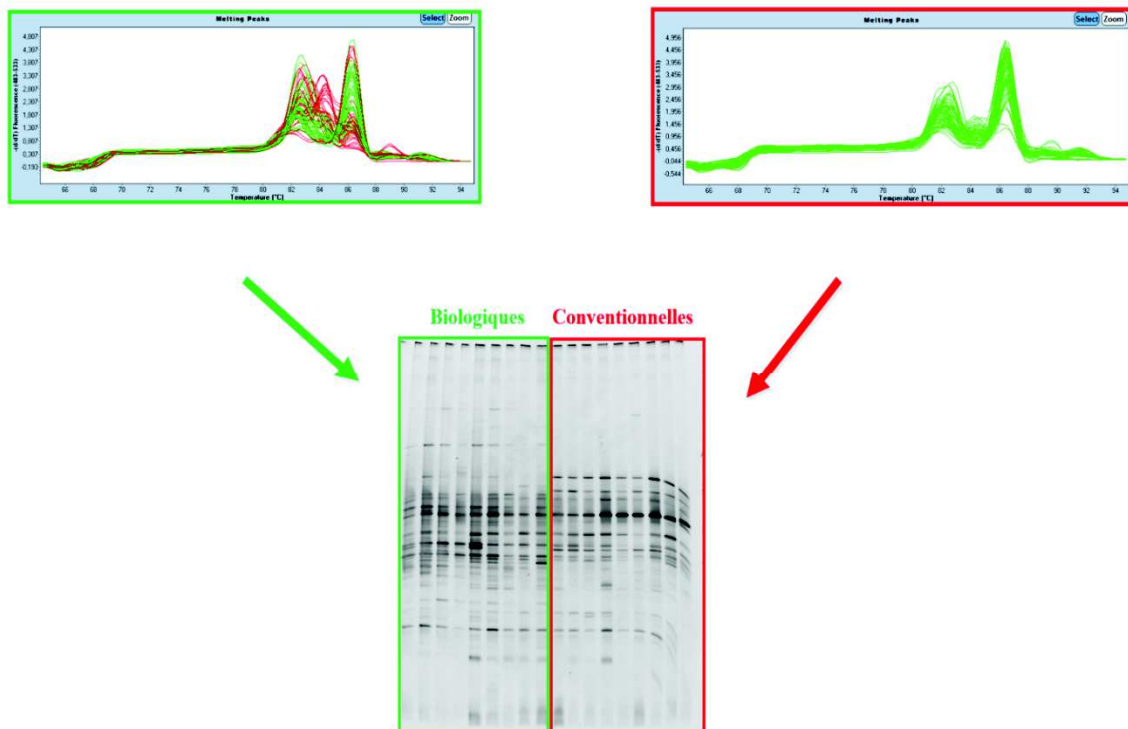


Figure 3.25. Comparaison des profils génétiques obtenus par HRM et DGGE pour l'étude de la flore fongique présente à la surface de pommes biologiques et conventionnelles.

Exemple des pommes échantillonnées en 2013.

3.3.1.5. Conclusion partielle

L'application de l'indice de Simpson sur les profils DGGE nous avait démontré que les différences entre les empreintes bio/non bio n'étaient pas observables au niveau de la diversité microbienne globale (prise en compte à la fois de la richesse et de l'abondance des bandes ADN) retrouvée sur les fruits en fonction de leur mode de production. Le séquençage des bandes ADN obtenues par la méthode de PCR-DGGE et les analyses par qPCR et HRM nous ont permis de déduire que les différences observées entre la flore fongique des fruits bio et celle retrouvée sur les fruits conventionnels seraient situées au niveau du nombre de taxons (richesse) qui composent cette microflore. Pour l'étude comparative de la flore bactérienne, les résultats justifient encore plus le besoin d'augmenter le niveau de résolution de notre approche. En effet, la discrimination était moins claire que dans le cas de la flore fongique, que ce soit en appliquant la PCR-DGGE ou encore la qPCR et la HRM. Les profils DGGE nous ont cependant permis de constater que la prise en compte de l'abondance de certaines espèces bactériennes (intensité des bandes), ou VIP, était nécessaire pour réaliser la discrimination des fruits bio.

La combinaison de ces différentes méthodes de biologie moléculaire nous a donc permis d'avoir une vision plus complète de la flore microbienne globale des pommes bio et conventionnelles.

3.3.2. ...vers l'identification des marqueurs ADN microbiens pour la discrimination

3.3.2.1. Identification des marqueurs ADN microbiens discriminants

L'identification des bandes ADN (issues de DGGE) par séquençage nous a permis d'obtenir dans un premier temps un aperçu de la composition globale des communautés microbiennes majoritaires présentes à la surface des pommes bio et conventionnelles, puis dans un second temps d'identifier les espèces les plus importantes pour la discrimination en fonction du mode de production. Pour faciliter la sélection des espèces discriminantes, l'analyse des VIP, par PLS-DA, s'est révélée être très utile quant au choix des bandes provenant des profils DGGE, en particulier bactériennes. De plus, ces VIP ont démontré leur intérêt lors de la discrimination des pommes en fonction du type d'agriculture dont elles étaient issues et donc leur importance pour notre étude.

Cependant, nous avons été confrontés à la difficulté de pouvoir généraliser la sélection et l'identification des marqueurs microbiens de toutes les pommes sur la seule base des

séquençages réalisés à partir des ADN prélevés des gels DGGE. En effet, outre le fait que les résultats obtenus sur gels à gradient dénaturant souffrent d'une réelle faiblesse dans leur précision taxonomique, il n'a pas été possible de regrouper les gels entre eux et donc de regrouper les résultats des profils bactériens et fongiques des 125 pommes étudiées. De plus, certaines VIP correspondaient à des espèces (ou marqueurs) ADN retrouvées à la fois sur les pommes bio et sur les pommes conventionnelles. Nous avons tout de même testé le regroupement de 3 gels en utilisant les VIP communs à l'ensemble des gels mais les résultats n'étaient pas très concluants : la discrimination des fruits selon leur mode de production était possible mais les variations entraînées par la démarche expérimentale (d'un gel DGGE à un autre) étaient trop importantes pour valider cette méthode de regroupement.

La seule possibilité qui était alors envisageable a été de comparer dans un premier temps les VIP qui ont été identifiées dans chacun des gels puis d'analyser leur position de migration relative dans le gel dénaturant par rapport à celles des souches de références afin de comparer les résultats entre ces gels et vérifier si les VIP correspondaient entre elles. Les VIP globales identifiées (ou espèces microbiennes discriminantes présentes sur l'ensemble des pommes) ont été retrouvées sur la seule base de l'analyse et de la comparaison de leur position entre les gels. Il a été constaté que 15 à 20 espèces microbiennes (bactériennes et fongiques) étaient nécessaires et suffisantes pour pouvoir réaliser la discrimination des pommes bio des pommes conventionnelles. Parmi ces espèces discriminantes, certaines ont pu être identifiées. Les résultats sont présentés dans les **Figures 3.26 et 3.27**.

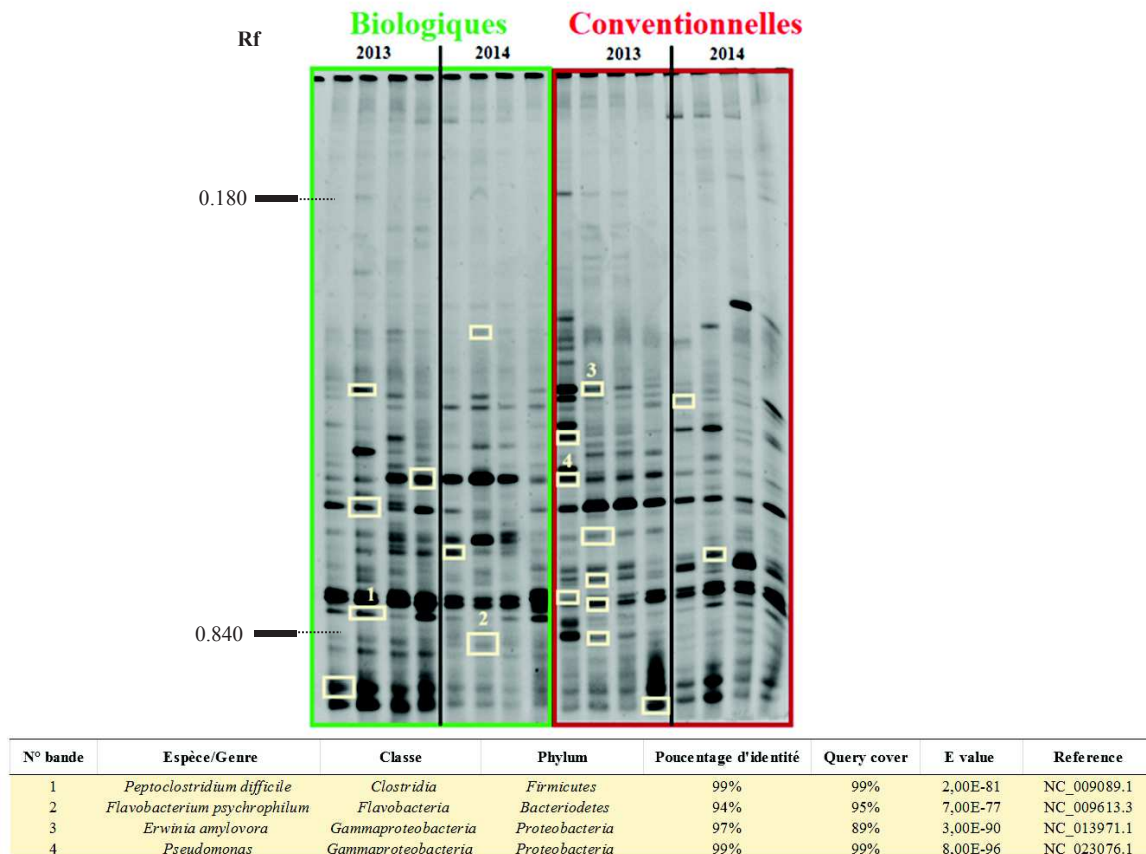


Figure 3.26. Bandes ADN bactériennes les plus discriminantes pour notre étude (ou VIP).

Les bandes qui ont pu être identifiées à partir du gel DGGE sont représentées par ordre d'importance dans le tableau et un numéro (N° bande) leur a été attribué.

Très peu de bandes bactériennes nécessaires pour réaliser significativement la discrimination des pommes bio (= VIP) ont pu être identifiées. Comme décrit précédemment, l'identification de ces bandes était délicate à réaliser, notamment parce que ces bandes étaient très intenses et très rapprochées les unes des autres. Ceci a rendu l'identification le plus souvent impossible.

Les bandes d'ADN bactériens qui correspondent aux VIP sont représentées sur le gel DGGE de la **Figure 3.26.**, celles qui ont pu être identifiées sont représentées dans le tableau correspondant. Parmi ces bactéries, deux d'entre elles faisaient partie du phylum des *Protéobactéries*. Il a été constaté que ce phylum était le mieux représenté lorsque l'on prenait en compte l'ensemble des espèces bactériennes identifiées (**cf. partie 3.3.1.2.2**). Malgré cela, les seules bandes discriminantes qui ont été identifiées correspondaient à des espèces qui appartenaient également aux phyla des *Firmicutes* et des *Bactéroidetes* laissant supposer que les *Protéobactéries* ne suffisent pas à elles seules pour la discrimination.

Outre les erreurs inhérentes à la méthode, celles liées aux bases de données doivent également être prises en compte (notamment dues ici à la faible taille des fragments d'ADN amplifiés). La qualité des séquences obtenues après DGGE peut aussi être un facteur qui amène à une identification peu fiable de la séquence ADN étudiée. Dans l'exemple de la **Figure 3.26.**, la bande n°2 correspond à une bactérie pathogène des poissons (**Starliper, 2011**), retrouvée ici sur des pommes. On peut donc dire que le nom de l'espèce identifiée dans ce cas ne correspond pas à la séquence ADN récupérée, mais qu'il faut se contenter du genre. Le clonage des bandes ADN récupérées des gels DGGE pourrait permettre d'améliorer la qualité des séquences, mais cette étape est longue et lourde à réaliser. Ces biais liés à la méthode et la complexité des analyses justifient l'intérêt d'appliquer la méthode du séquençage à haut débit, qui sera décrite dans la **partie 3.3.2.3.**

De façon similaire, les bandes discriminantes fongiques (VIP) n'appartenaient pas seulement à la division des *Ascomycètes* comme on aurait pu s'y attendre au vu des résultats obtenus après avoir rassemblé l'ensemble des séquences identifiées après PCR-DGGE (**cf. partie 3.3.1.2.1**).

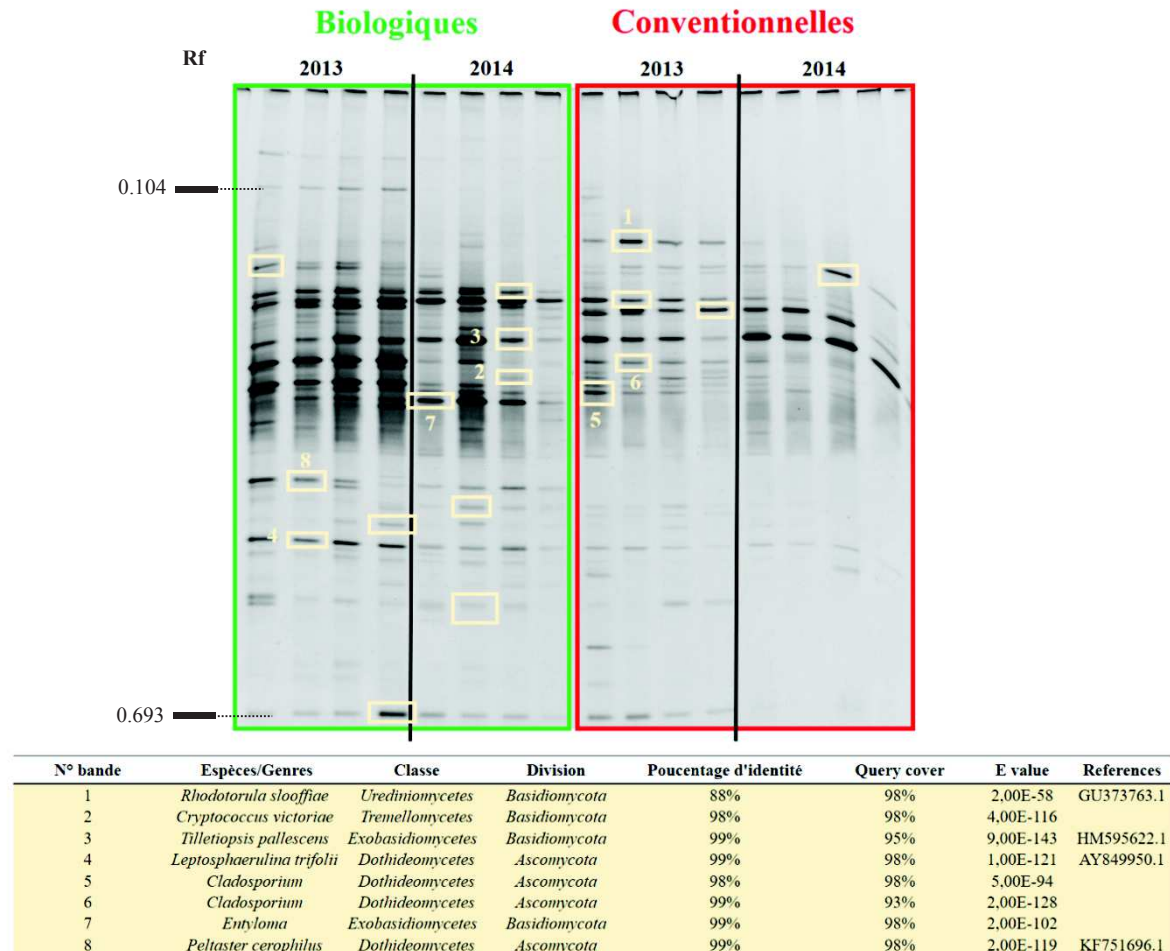


Figure 3.27. Bandes ADN fongiques les plus discriminantes pour notre étude (ou VIP). Les bandes qui ont pu être identifiées à partir du gel DGGE sont représentées par ordre d'importance dans le tableau et un numéro leur a été attribué.

Les espèces fongiques appartenant aux deux divisions sont donc nécessaires pour discriminer les fruits en fonction de leur mode de production, avec une plus grande diversité d'espèces appartenant à la division des *Basidiomycètes* par rapport à celles appartenant à la division des *Ascomycètes*. En effet, les 4 espèces fongiques affiliées aux *Basidiomycètes* appartiennent à 4 classes différentes tandis que celles qui sont affiliées à la division des *Ascomycètes* appartiennent toutes à la classe des *Dothideomycetes*. Comme mentionné précédemment, les membres de la classe des *Dothideomycetes* sont souvent retrouvés comme pathogènes, endophytes ou épiphytes des plantes (Schoch *et al.*, 2006 ; Ohm *et al.*, 2013). On retrouve d'ailleurs, parmi les VIP appartenant à cette classe, *Peltaster cerophilus* reconnu comme étant à l'origine de l'apparition de tâches de suie sur la peau des pommes, tout comme *Peltaster fructicola* (Medjedović *et al.*, 2014). On a pu identifier également dans cette classe des espèces phytopathogènes appartenant aux genres *Phoma* et *Leptosphaeria* (Gruyter *et al.*, 2013).

Les groupes fongiques discriminants seraient donc en majorité constitués d'espèces phytopathogènes. À noter cependant qu'il faudrait vérifier le potentiel pathogène des espèces fongiques discriminantes identifiées (étude de l'expression de facteurs de virulences) pour pouvoir confirmer qu'il s'agit bien d'espèces phytopathogènes.

3.3.2.2. Conclusion partielle

Une fraction minime de bandes ADN issues de la méthode DGGE a pu être identifiée pour permettre de déterminer les espèces qui seraient les marqueurs de discrimination spécifiques aux fruits bio. Les résultats ont tendance à nous faire pencher vers l'analyse ciblée de groupes microbiens, par exemple les champignons phytopathogènes. Les marqueurs microbiens recherchés appartiendraient soit au groupe conventionnel soit au groupe bio.

Nous avons par la suite appliqué une méthode de séquençage ADN à haut débit (ou Next Generation Sequencing, NGS) afin de chercher des marqueurs ADN pour la discrimination des pommes en fonction de leur mode de production et comparer avec les résultats obtenus par analyse des bandes ADN bactériennes (DGGE).

3.3.2.3. Application du séquençage ADN à haut débit

Afin de pallier les limites de la PCR-DGGE et comparer les résultats de l'identification des bandes ADN bactériennes obtenues, certains échantillons ont été analysés en utilisant une approche de séquençage nouvelle génération. En effet, la démocratisation des techniques de séquençage à haut débit, et la baisse des coûts d'analyse nous ont permis d'avoir accès à ces technologies pour une étude comparative des pommes issues des différents types d'agriculture. Nous souhaitons croiser et regrouper les informations de séquençage obtenues en DGGE et en NGS afin de i) fournir une information qualitative et quantitative de la microflore des pommes bio et conventionnelles, et ii) parfaire les identifications précédemment obtenues par le séquençage des bandes de DGGE en complétant cette information avec celles obtenues par du séquençage à haut débit et valider ou non les groupes microbiens discriminants identifiés.

La méthode de séquençage Illumina (Miseq) a été appliquée pour l'étude de la flore bactérienne dont les résultats ont pu être traités par la plateforme GeT-PLaGe de l'équipe NED à l'INRA de Toulouse. Pour cela, la région V3-V4 de l'ADNr 16S a été préalablement amplifiée (voir **Tableau 2.12.** pour les amorces ADN) et les amplicons obtenus ont ensuite

été envoyés à la plateforme qui a procédé à l'analyse de 50 000 séquences (V3-V4 de 500 pb) par échantillon. La table d'abondance des OTU a été obtenue suite à l'étude de 2000 séquences les plus représentatives dans chacun des échantillons.

Le séquençage Illumina (Miseq) a été appliqué sur les mêmes extraits d'ADN génomiques qui ont été utilisés pour l'ensemble de nos analyses décrites plus haut (DGGE, qPCR et HRM). Dix échantillons bio et dix échantillons conventionnels ont été testés, une partie de ces échantillons (bio et conventionnels) étaient issue de pommes provenant du bord d'une parcelle et une autre de pommes cultivées au centre de cette même parcelle. Les groupes taxonomiques (OTU) obtenus pour des échantillons d'un même type d'agriculture ont été dans un premier temps regroupés entre eux afin d'avoir un aperçu global de la flore bactérienne présente sur des pommes issues de deux types d'agriculture. Par mesure de simplification, ces groupes taxonomiques ont été regroupés au niveau de leur division. Les résultats obtenus à l'issue de ces travaux ont tout d'abord permis de mettre en lumière la présence de communautés bactériennes extrêmement riches et diversifiées. Plusieurs milliers d'unités taxonomiques opérationnelles ont été identifiées dans les échantillons collectés dans les deux parcelles de pommiers étudiées (bio et conventionnels). Les proportions des différentes espèces identifiées comme appartenant à un taxon bactérien spécifique sont représentées dans les **Figures 3.28. et 3.29.** Seuls sont illustrés les groupes qui présentaient une abondance supérieure à 1% dans la **Figure 3.28.** tandis que les autres, dont les proportions étaient inférieures ou égales à 1%, sont illustrés dans la **Figure 3.29.** La somme totale des bactéries minoritaires ne dépassait pas les 1% même après avoir regroupé tous les échantillons d'un même type d'agriculture entre eux.

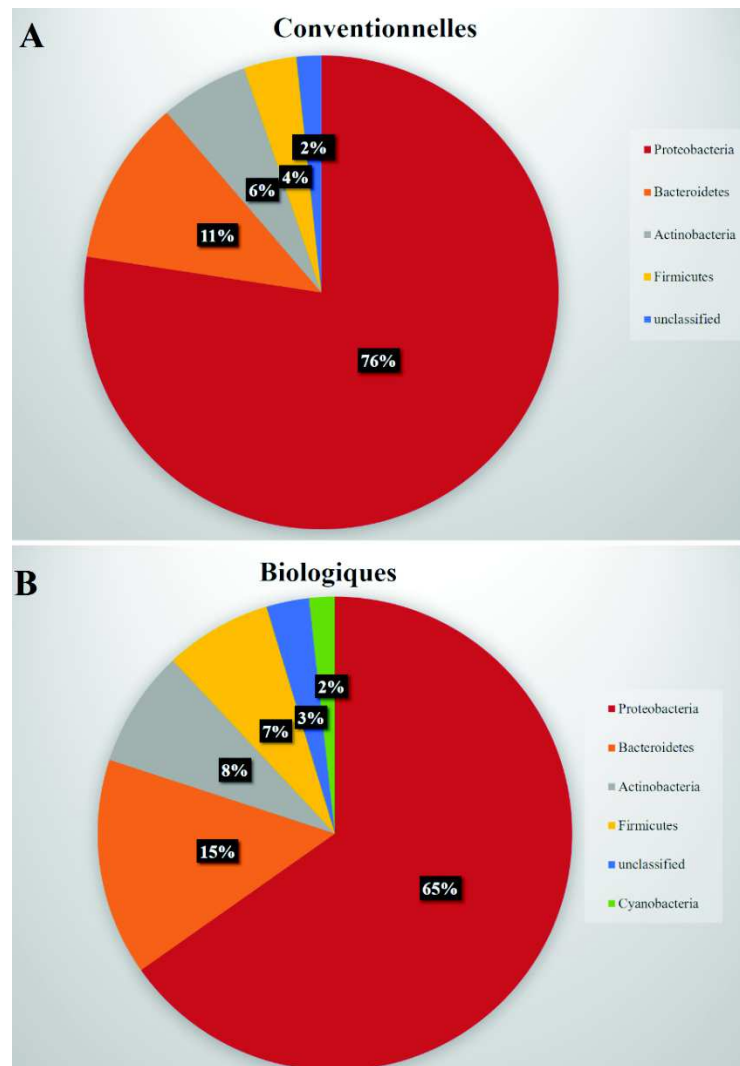


Figure 3.28. Proportion centésimale des principaux phyla bactériens identifiés sur des pommes (A) conventionnelles et (B) biologiques récoltées en 2013.
Les calculs des pourcentages ont été réalisés sans prendre en compte les espèces minoritaires.

On peut constater que les cinq grands groupes bactériens identifiés suite au séquençage des bandes ADN (issues de gels DGGE) ont également été retrouvés après séquençage à haut débit (par la méthode Illumina) : les Protéobactéries, les *Bactéroidetes*, les *Actinobacteria*, les *Firmicutes* et les *Cyanobactéries* (dans l'ordre d'importance). De même, une plus grande proportion de *Protéobactéries* a été retrouvée dans les échantillons conventionnels. Les autres groupes bactériens sont plus abondants dans les échantillons bio dans lesquels on retrouve également le phylum des *Cyanobactéries* parmi les groupes bactériens majoritaires alors que pour les échantillons conventionnels les *Cyanobactéries* sont parmi les groupes minoritaires (Figure 3.28.).

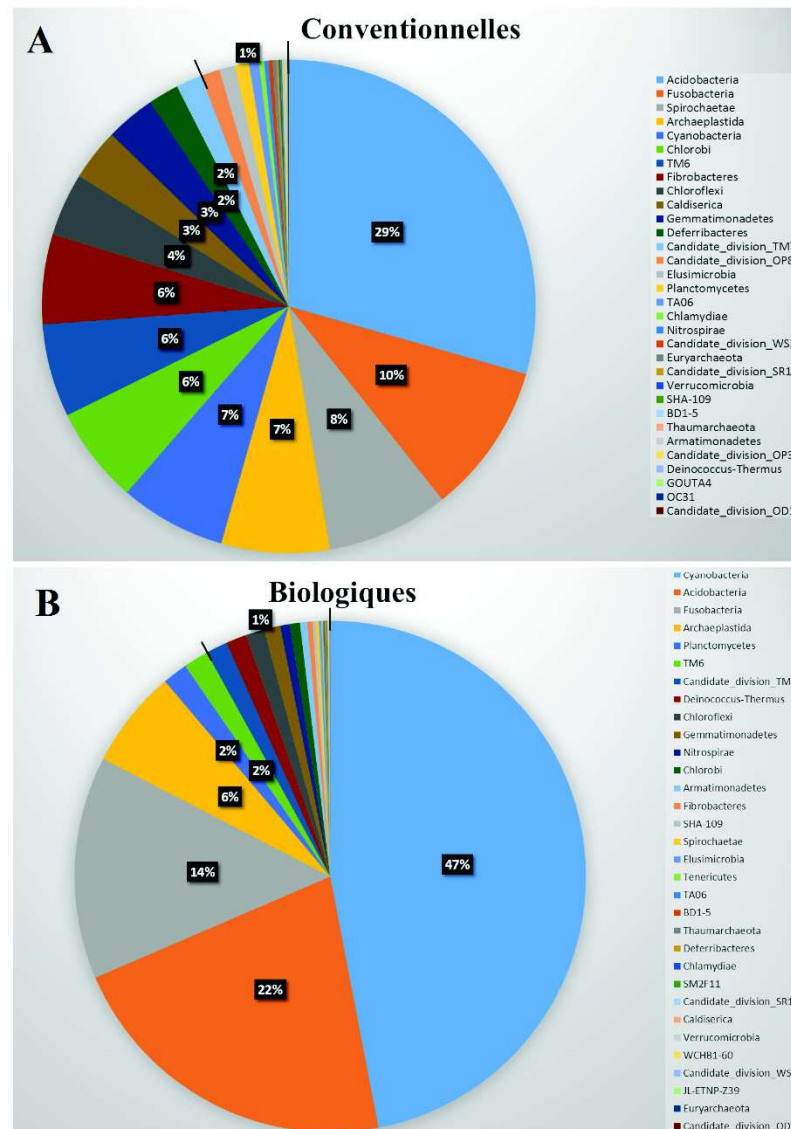


Figure 3.29. Proportion centésimale des bactéries minoritaires identifiées sur des pommes (A) conventionnelles et (B) biologiques récoltées en 2013.

Le pourcentage a été adapté pour ces espèces minoritaires, elles ne représentaient pas plus de 1% des espèces bactériennes totales présentes dans les échantillons.

Au niveau des espèces minoritaires, les différences entre les pommes bio et les pommes conventionnelles sont plus flagrantes, avec 4 groupes principaux dans les échantillons bio et 2 groupes pour les conventionnels (**Figure 3.29.**). De plus, dans le groupe conventionnel, les espèces semblent se répartir plus fortement dans les autres groupes bactériens. Ces groupes bactériens étaient également retrouvés sur les pommes bio. Les différences ne sont donc pas situées au niveau de la richesse des groupes bactériens mais plutôt au niveau de l'abondance des espèces qui composent ces groupes : une plus grande proportion de *Cyanobactéries* peut être observée dans les échantillons bio, suivies par les

Acidobactéries puis par les *Fusobactéries*. Alors que pour les échantillons conventionnels on retrouvait principalement les *Acidobactéries* puis les *Fusobactéries*.

La PLS-DA a ensuite été appliquée afin de vérifier si les différences observées entre les pommes bio et conventionnelles étaient significatives, en utilisant à la fois les espèces majoritaires et les espèces minoritaires. Les données correspondant aux proportions (en pourcentage) des différents phyla bactériens retrouvés sur chaque échantillon de pomme testé ont été utilisées comme variables explicatives (ou variables X), à l'image de ce qui avait été réalisé avec les valeurs des « band % » obtenues sur les gels DGGE. Une sélection des variables les plus significatives pour notre modèle a été réalisée en utilisant l'analyse des VIP. Les VIP ayant une valeur supérieure ou égale à 1 ont permis d'améliorer notre modèle et ont donc été conservées. Les autres ont été exclues du modèle. Avant d'effectuer cette sélection, la qualité de notre modèle (Q^2_{cum}) était très médiocre : l'indice Q^2_{cum} restait faible (0,5) même en augmentant le nombre de composantes. À partir de 4 composantes la valeur de Q^2_{cum} diminuait. Cela suggère que la qualité de l'ajustement pouvait être très variable en fonction des pommes (bio vs conv.), soulignant ainsi la nécessité de supprimer les variables X non-significatives. Cette sélection a d'ailleurs permis d'augmenter la qualité de notre modèle de 20% (la valeur de Q^2_{cum} est passée de 0,5 à 0,7 et deux composantes suffisent pour faire la discrimination). Un échantillon conventionnel a dû être supprimé car ce dernier présentait des résultats aberrants et diminuait la qualité de notre modèle de 10%.

Les résultats sont illustrés dans la **Figure 3.30**, où sont représentés la dispersion des individus d'une part (bactéries) (**Figure 3.30.A**) et la dispersion des observations (échantillons bio et conventionnels) d'autre part (**Figure 3.30.B**).

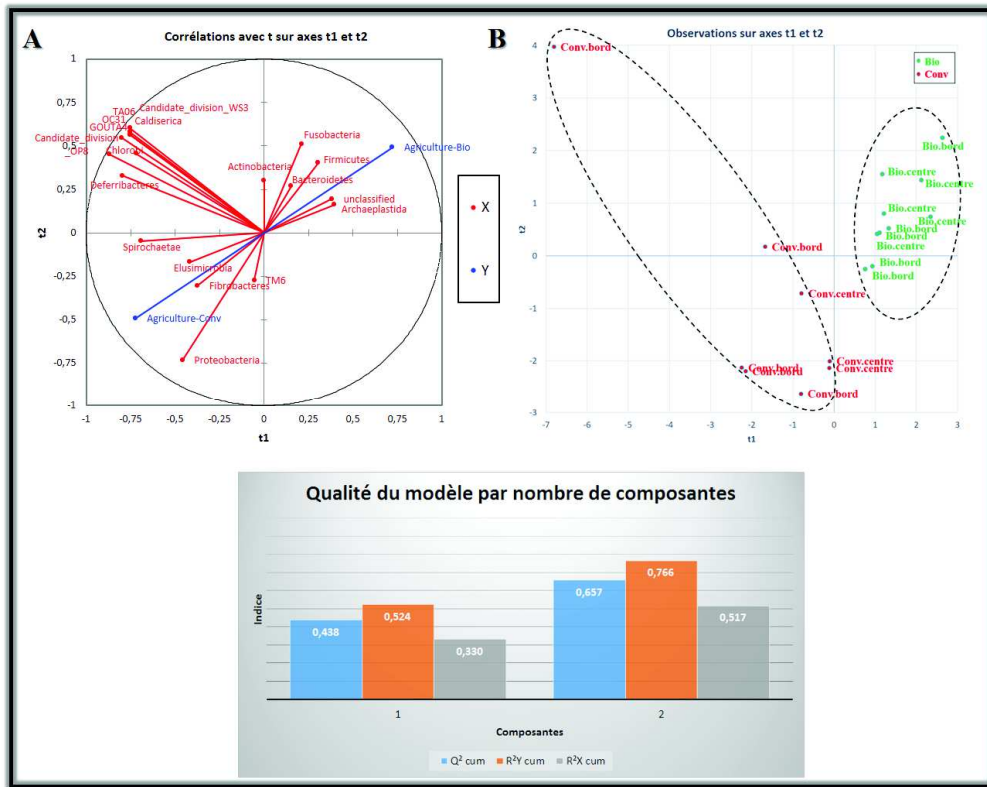


Figure 3.30. Graphiques des corrélations générés par l'analyse discriminante PLS
(A) Corrélations entre les variables X et les variables Y du modèle (Bio/Conv).
(B) Répartition des individus sur les axes t à partir des variables explicatives initiales.
 La classe biologique (Bio) et la classe conventionnelle (Conv) sont représentées en bleu, les variables quantitatives explicatives (X) sont représentées en rouge dans le graphique.

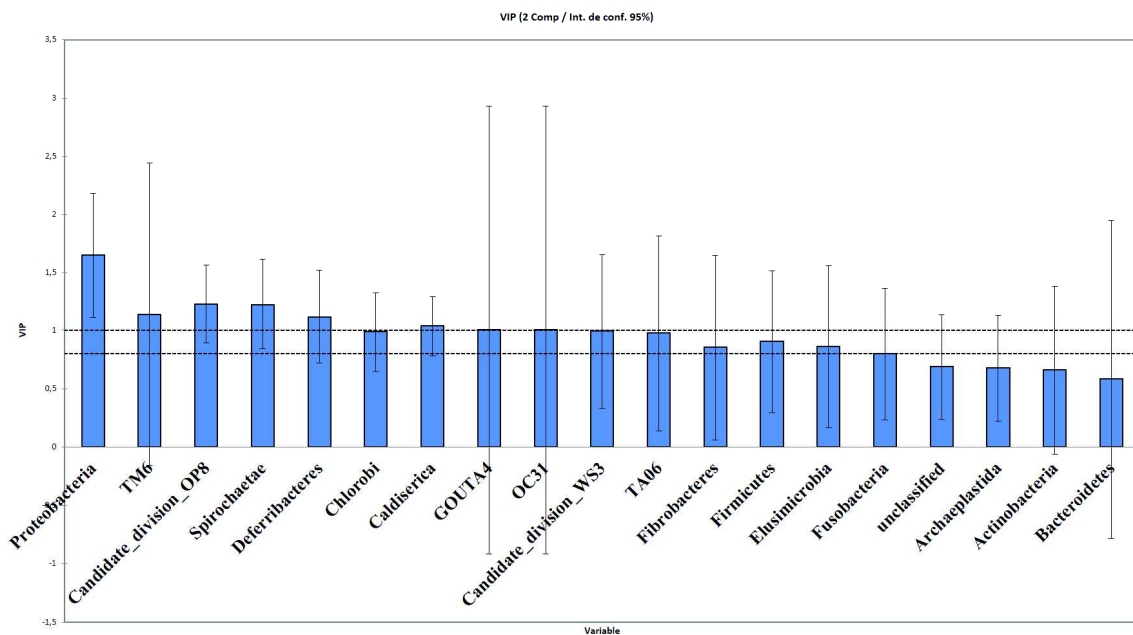


Figure 3.31. Résultats de la régression PLS montrant l'importance des différentes variables X dans le modèle (VIP) sur la deuxième composante.

De plus, le graphique des VIP (**Figure 3.31.**) nous a permis d'identifier les groupes bactériens les plus importants pour la discrimination. Parmi eux, on retrouve les 4 phyla majoritaires représentés dans la **Figure 3.28.** : les *Protéobactéries*, les *Bactéroidetes*, les *Actinobactéries* et les *Firmicutes*. Mais on constate également que les groupes minoritaires (dont les proportions étaient inférieures à 1%) sont aussi importants pour la discrimination des pommes bio. Certains d'entre eux n'ont pas pu être identifiés mais la suppression de ces groupes réduit la qualité de notre modèle justifiant leur pouvoir discriminant. Par ailleurs, cela confirme le constat qui a été émis dans la conclusion de la précédente partie (**3.3.2.2**) : il n'y a pas de marqueurs spécifiques du bio mais plutôt des groupes microbiens de discrimination dont certains appartiennent soit au groupe conventionnel soit au groupe bio, tandis que d'autres ne sont pas classables (**Figure 3.30.A**). Il faudrait donc privilégier une analyse plus ciblée, pour pouvoir réaliser efficacement la discrimination des pommes bio des pommes conventionnelles.

3.3.3. Conclusion

Pour conclure ce chapitre, l'application d'outils moléculaires variés nous a permis d'évaluer, de la façon la plus exhaustive possible, la structure des microflore bactériennes et fongiques qu'il était possible de retrouver sur des pommes issues de deux types différents d'agriculture. L'étude de la composition des communautés microbiennes de ces fruits, que ce soit par séquençage de bandes ADN obtenues par PCR-DGGE ou par séquençage à haut débit (Illumina), ne nous permet pas d'accéder à un niveau d'information très résolutif mais, elle nous a tout de même amené à avoir une meilleure connaissance de la flore microbienne naturelle présente à la surface des pommes ainsi que des groupes microbiens les plus discriminants pour notre étude.

De façon générale, l'étude de la structure des communautés microbiennes des fruits démontre que ces derniers peuvent abriter des populations bactériennes et fongiques très riches et variées. Les analyses par séquençage des bandes ADN obtenues par PCR-DGGE combinées avec les analyses de NGS (Illumina) démontrent que les *Protéobactéries*, les *Bactéroidetes*, les *Actinobactéries* et les *Firmicutes* sont les principaux groupes bactériens qui permettent la discrimination des pommes bio des pommes conventionnelles. Les analyses statistiques (PLS-DA) ont permis de confirmer l'importance de ces groupes bactériens pour la discrimination des fruits en fonction de leur type d'agriculture et l'intérêt d'effectuer une analyse plus ciblée de la flore microbienne : les espèces qui ne contribuent pas à la

discrimination masquent l'information apportée par celles qui sont nécessaires à cette différenciation. D'autres recherches plus poussées sont nécessaires pour confirmer les phylotypes associés à un mode de production et nous assurer que cela s'applique aussi bien aux pommes qu'à d'autres aliments. Nos résultats étant corrélés avec de précédentes études ayant investigué la flore bactérienne de fruits (**Ottesen *et al.*, 2009 ; Leff *et al.*, 2013**), cela montre leur pertinence et encourage à poursuivre sur cette voie pour pouvoir mettre au point à plus long terme un outil, de type puces à ADN ou qPCR (HRM) multiplexe, pour la discrimination des aliments bio.

Par ailleurs, il a été constaté d'après les résultats de qPCR et HRM qu'aucune différence notable n'existait entre les pommes bio de la parcelle 2 et les autres types de pommes (2013 et 2014), alors que les empreintes génétiques par PCR-DGGE démontraient que ces fruits étaient très proches des autres pommes bio (de 2013 et de 2014). Cela pourrait être dû au fait que le nombre d'échantillons était trop faible (n=5). Entre ce constat et le fait qu'il existe une variabilité entre deux pommes provenant d'une même parcelle (**cf. partie 3.3.1.3**), cela souligne l'intérêt de définir un lot authentifiable et de ne pas se baser sur l'analyse d'une seule et unique pomme pour pouvoir déterminer son mode de production.

3.4. APPLICATION À D'AUTRES FRUITS

Dans les chapitres précédents, nous avons montré qu'il était possible de discriminer les pommes bio des pommes conventionnelles par analyse comparative des communautés microbiennes présentes sur leur peau. Un des objectifs de notre étude est de proposer une approche à la fois simple, robuste et peu coûteuse pour la discrimination de fruits selon leur système de production. Ce dernier chapitre présente l'application de notre approche sur d'autres types de fruits : les pêches, les nectarines et les bananes.

3.4.1. Discrimination des pêches et des nectarines en fonction de leur mode de production

Nous avons choisi de regrouper dans cette même partie les résultats obtenus sur les pêches et les nectarines du fait que ces deux fruits sont issus de la même famille (la nectarine est une variété de pêche). Les bio-agresseurs et donc les traitements appliqués au verger sont très similaires. La principale différence étant que la nectarine a une peau lisse et brillante contrairement à la pêche qui a une peau duveteuse (**cf. partie 2.1.3.2**). Les profils DGGE ont été analysés séparément pour les pêches et les nectarines puisque l'effet variétal peut impacter de façon significative la flore microbienne des aliments (**cf. partie 3.4.2**). Étant donné qu'aucune différence n'ait été observée au niveau de la flore bactérienne et de la flore fongique des différentes variétés de pêches (Corindon et Amanda) ou de nectarines (Ambre, Western Red et Star Pearl), les fruits ont été étudiés indépendamment de ce paramètre.

3.4.1.1. Étude de l'empreinte génétique de la flore fongique de pêches et de nectarines

Les profils DGGE (fongiques) entre les pêches et les nectarines d'un même mode de production sont visuellement similaires. Cependant, certaines bandes ADN peuvent être présentes dans un profil et absentes dans un autre, ou avoir des intensités (abondances) différentes (**Figure 3.32**). D'après les analyses ACP et de clustering (**Figures 3.33 et 3.34**), un niveau de similarité allant de 65 à 90% entre des fruits issus d'un même mode de production est obtenue. Cela démontre que la variation inter-fruits est détectable mais qu'elle n'est pas importante.

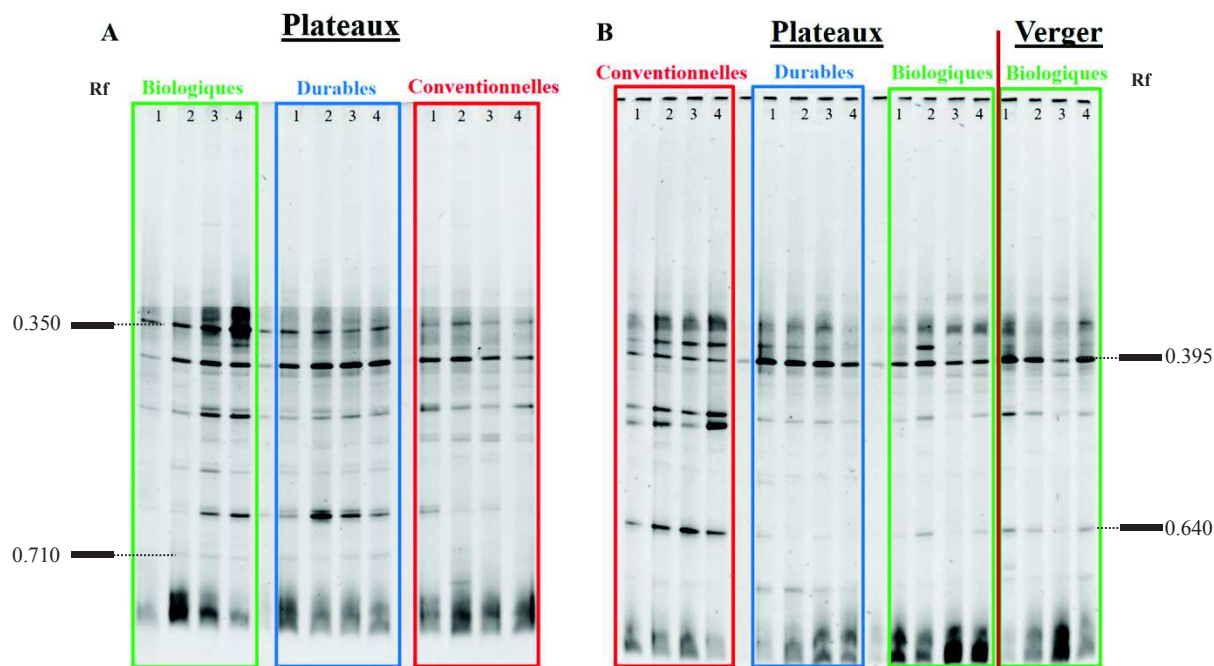


Figure 3.32. Profils DGGE fongiques (ADNr 26S) (A) de nectarines et (B) de pêches issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

Les profils DGGE des différents fruits analysés montrent que la richesse fongique est similaire entre les pêches et les nectarines (en moyenne 14 bandes ADN).

La somme des pourcentages des deux premières composantes principales de l'ACP montre qu'environ 70% de la variance est expliquée et que l'axe 1 (« Fact. 1 ») contribue majoritairement à la dissociation des différents groupes (**Figure 3.33.**). Dans le cas des nectarines, cet axe (Fact.1 = 57,95%) permet de dissocier les échantillons conventionnels des échantillons bio et durables (**Figures 3.33.A**). En effet, les deux clusters principaux (**Figure 3.34.A**) sont constitués par les nectarines bio/durables d'une part et les nectarines conventionnelles d'autre part, avec respectivement 90% et 80% de similarité.

Concernant les résultats obtenus pour les pêches, le graphique de l'ACP (**Figure 3.33.B**) démontre que les pêches bio du verger sont séparées de celles prélevées sur les plateaux de la coopérative par l'axe 1 (Fact.1 = 52,72%). Cet axe regroupe d'ailleurs les fruits bio du verger avec les pêches conventionnelles échantillonnées sur les plateaux (**Figure 3.33.B**). L'analyse par clustering de la **Figure 3.34.B** démontre que le niveau de similarité entre ces échantillons est significatif (65%). Le niveau de similarité est encore plus important

entre les échantillons de pêches bio et de pêches durables (toutes prélevées sur les plateaux) avec 75% (**Figure 3.34.B**). La composition de la flore fongique est donc différente entre les pêches bio provenant du verger et celles qui ont été stockées à 1°C. Ce paramètre de conservation entraînerait une modification de l'information génétique microbienne associée au fruit.

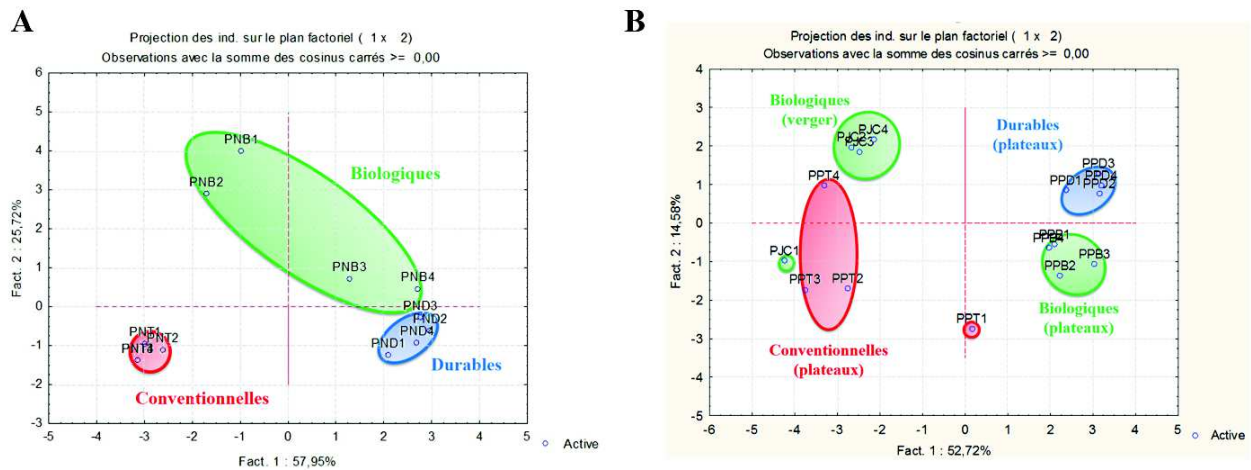


Figure 3.33. Analyses par ACP des profils fongiques (ADNr 26S) obtenus par analyse DGGE (A) de nectarines et (B) de pêches du verger et de plateaux de la coopérative, issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

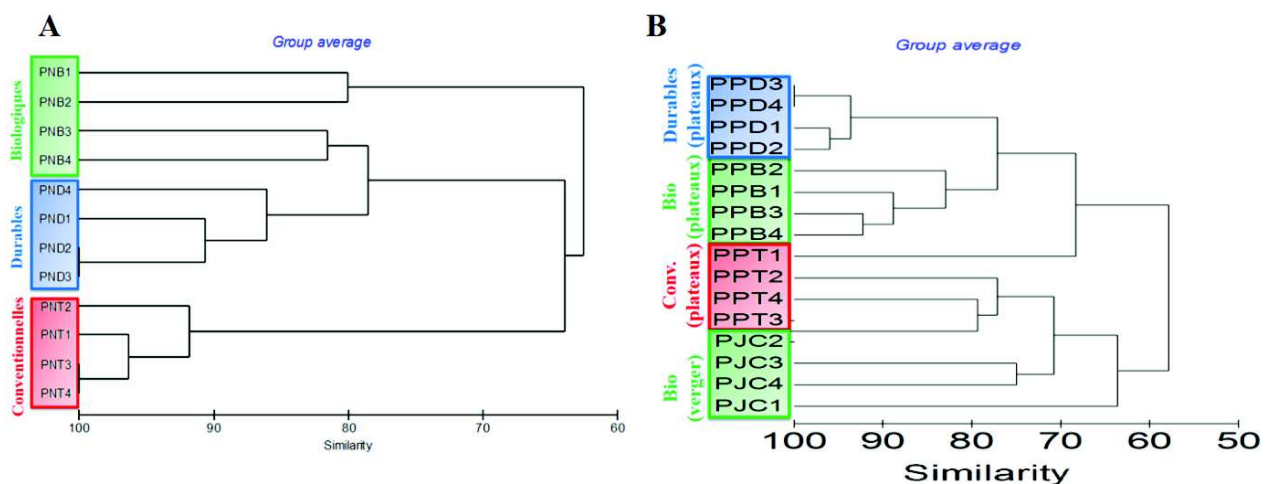


Figure 3.34. Analyses par clustering des profils fongiques (ADNr 26S) obtenus par analyse DGGE (A) de nectarines et (B) de pêches du verger et de plateaux de la coopérative, issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

L'étude de l'empreinte génétique de la flore fongique des pêches et des nectarines a donc démontré que les traitements au champ ont une influence mesurable et qu'il était possible de discriminer les fruits en fonction de leur type d'agriculture, mais aussi en fonction de leur état de fraîcheur (plateau vs verger). Dans la partie suivante de ce chapitre, nous souhaitons vérifier si cette discrimination sera également possible par l'analyse de la flore bactérienne de ces mêmes fruits.

3.4.1.2. Étude de l'empreinte génétique de la flore bactérienne de pêches et de nectarines

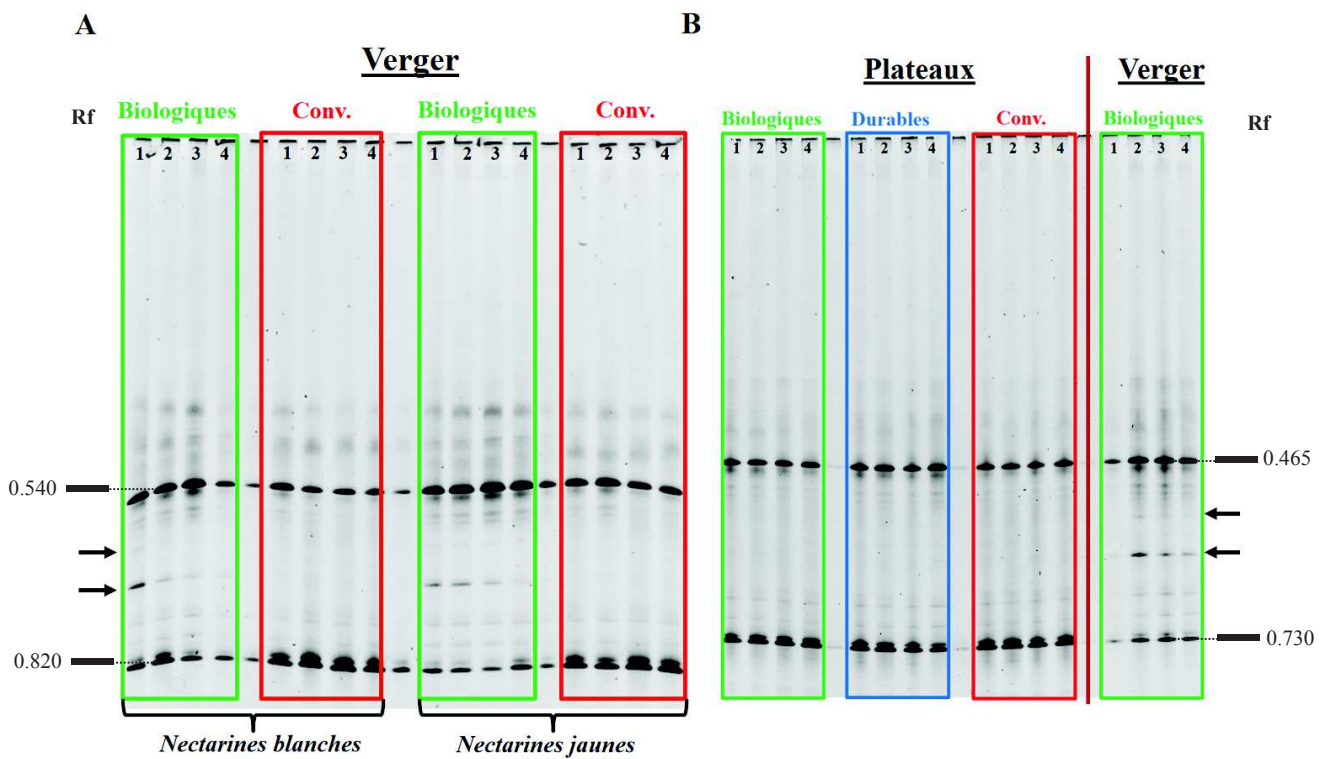


Figure 3.35. Profils DGGE bactériens (ADNr 16S) (A) de nectarines et (B) de pêches du verger et de plateaux de la coopérative, issues de trois modes de production : biologique, durable et conventionnel.

→ *Bacillus cereus* group.

Tout comme cela a été relevé pour l'étude de la flore fongique globale des pêches et des nectarines, la richesse bactérienne est similaire entre les différents fruits étudiés (avec en moyenne 15 bandes ADN détectées). On constate également que les profils bactériens sont visuellement similaires entre les fruits d'un même mode de production (**Figure 3.35.**). De plus, des bandes ADN spécifiques aux fruits bio sont observables, aussi bien sur les pêches que sur les nectarines (représentées par des flèches sur la **Figure 3.35.**), et disparaissent

lorsque les fruits sont conservés au froid (**Figure 3.35.B**). Cela confirme l'hypothèse précédemment établie : il y a bien une modification de l'information génétique microbienne, en l'occurrence une perte, due à la conservation des fruits au froid. Ce paramètre est donc important à prendre en considération pour pouvoir réaliser la discrimination. Ces bandes ADN ont ensuite été purifiées et identifiées par séquençage. Les résultats indiquent que ces bandes ADN appartiennent au groupe des *Bacillus cereus* avec un pourcentage d'identité égal à 99%. Dans ce groupe on retrouve *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. pseudomycoïdes* et *B. weihenstephanensis*. Les espèces qui constituent ce groupe sont très proches phylogénétiquement (**Park et al., 2007**). Il est donc très difficile de les différencier avec la portion de gène utilisée dans notre étude. Nous pouvons cependant supposer qu'il s'agit de *B. thuringiensis*. S'il s'avère qu'il s'agit bien de cette bactérie, cette dernière pourrait présenter un intérêt en tant que marqueur microbien pour la discrimination des fruits biologiques. Cependant, des tests supplémentaires seront nécessaires pour valider ce marqueur bactérien discriminant. En effet, bien que largement utilisée comme insecticide naturel en AB, rien n'oblige les producteurs bio d'appliquer des traitements à base de *B. thuringiensis*. Tout comme rien n'interdit les producteurs en agriculture conventionnelle d'appliquer ce type de traitement insecticide. Sans compter les risques de contamination entre les champs bio et non-bio.

Les analyses ACP ont ensuite été appliquées mais les variations mesurées entre les différents types de fruits (bio, durables et conventionnels) n'ont cependant pas permis de visualiser une différenciation des échantillons selon leur mode de production. Et ce, malgré les différences visibles directement à partir du gel DGGE. Ce constat avait également été établi lors de l'étude de la flore bactérienne des pommes bio et conventionnelles. Nous avons donc appliqué la PLS-DA en combinant à la fois l'étude de l'abondance bactérienne (intensité des bandes) et de leur richesse (nombre de bandes) comme décrit dans le chapitre 2. La **Figure 3.36**. montre les résultats obtenus à partir de l'analyse des données issues des bandes ADN les plus importantes (VIP). Ces bandes ont été sélectionnées car elles permettaient d'obtenir un modèle plus discriminant (seuls les indices VIP dont la valeur était supérieure à 1 étaient considérés comme importants et ont été utilisés pour cette deuxième PLS-DA).

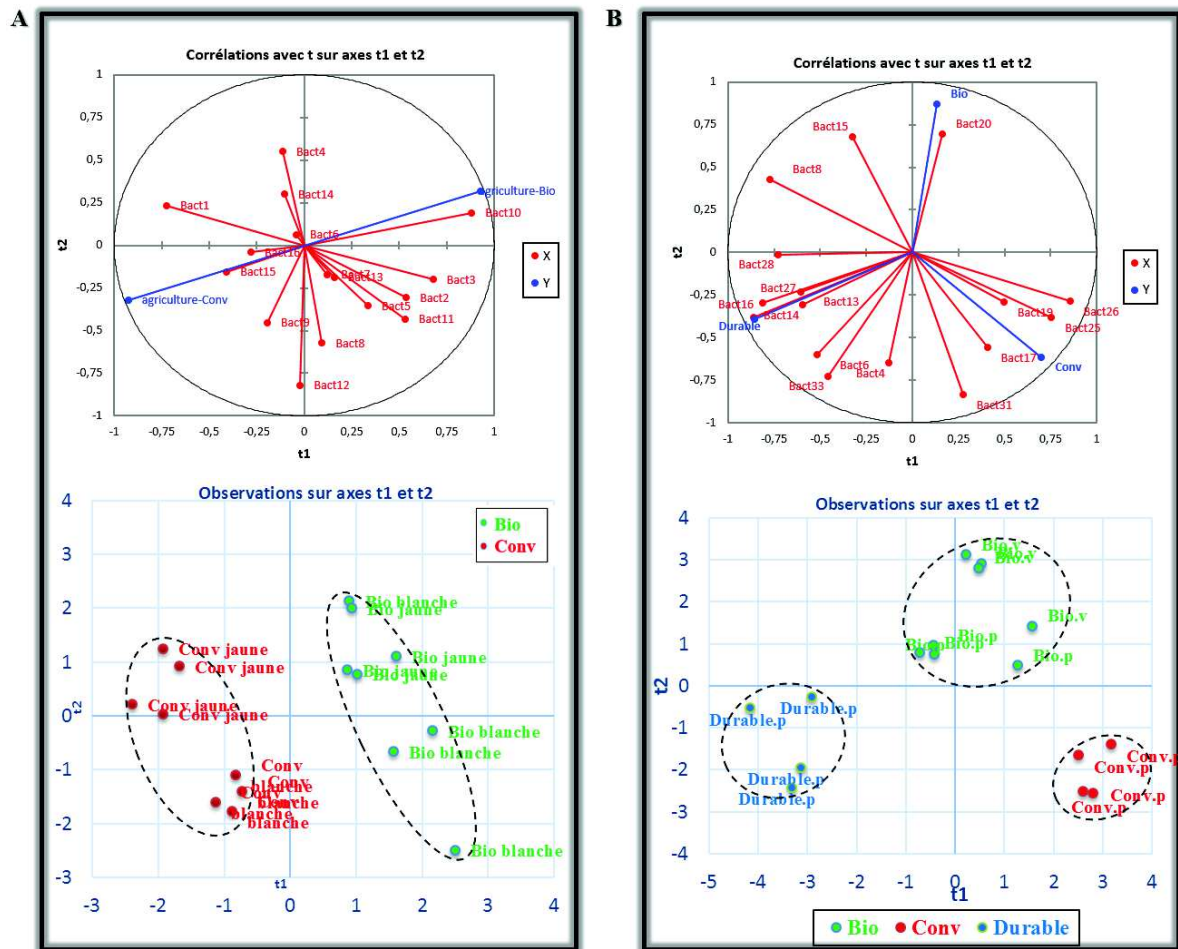


Figure 3.36. Graphiques des corrélations générés par l'analyse discriminante PLS.

(A) à partir des données de nectarines et (B) de pêches.

Dans les cercles de corrélations, les classes correspondant aux différents modes de production sont représentées en bleu et les variables quantitatives (X) en rouge.

**Bactn* = Bactérie + numéro (ou bande du gel DGGE)

**jaune ou blanche* = pêches/nectarines blanches ou jaunes

**.p ou .v* = fruit échantillonné dans un plateau ou dans le verger

Les graphiques de la **Figure 3.36.** représentent les corrélations entre les variables X (*Bactn**) et les variables Y du modèle (Bio/Conv/Durable) ainsi que la répartition des individus sur les axes t à partir des variables explicatives. Ils montrent que les nectarines (**Figure 3.36.A**) et les pêches (**Figure 3.36.B**) bio sont corrélées négativement avec leurs homologues conventionnels et durables. La répartition des échantillons dans le graphique du bas illustrent la discrimination par l'axe t1. Pour des nectarines blanches, jaunes ou des pêches provenant des plateaux, ou du verger de la coopérative, les traitements appliqués induisent donc des variations sur la flore bactérienne mesurables par PCR-DGGE. Les histogrammes représentant la “Qualité du modèle par nombre de composantes” dans la

Figure 3.37., indiquent que nos modèles sont validés avec une valeur R^2Y égale à 0,9 et une valeur de Q^2cum supérieure à 0,5, à partir de la première composante pour les nectarines et de la deuxième pour les pêches. Nos deux modèles sont donc prédictifs.

Comme décrit plus haut pour l'étude de la flore fongique de ces mêmes fruits, un effet de conservation (plateaux vs verger), ou état de fraîcheur des fruits, a été mis en évidence (**Figure 3.36.B**). Cet effet modifie la flore microbienne, ou du moins, l'information mesurée par les empreintes génétiques. On peut envisager une possible croissance et la disparition de certaines espèces microbiennes présentes à la surface des fruits. Ce point souligne l'intérêt d'optimiser les étapes d'extraction des ADN en les rendant plus efficaces afin d'extraire l'ADN des microorganismes tant sous la forme végétative que sous la forme sporulée.

Il est également intéressant de constater que le marqueur bactérien Bact10 présent sur les nectarines (**Figures 3.36.A et 3.37.A**), et le marqueur bactérien Bact15 présent sur les pêches (**Figures 3.36.B et 3.37.B**), correspondent à des espèces bactériennes identifiées comme appartenant au groupe des *Bacillus cereus*. Chacune de ces bactéries contribue plus à expliquer la « classe Bio » que les autres classes. De façon similaire, il est possible que certaines bactéries contribuent majoritairement à la classe Conv ou à la classe Durable, alors que d'autres contribuent autant à une classe plutôt qu'à une autre. Par exemple, dans la **Figure 3.36.B**, les marqueurs bactériens Bact14, 13, 16 et 27 contribuent plus à expliquer la « classe Durable » et les marqueurs bactériens Bact17, 19, 25 et 26 à la « classe Conv ». Dans la **Figure 3.37.A**, les marqueurs bactériens Bact4, 8, 12 et 14 contribuent autant à l'une ou l'autre des classes.

L'ordre d'importance des bandes ADN bactériennes (variables Bactn), d'intérêt pour la discrimination des fruits bio des autres fruits, est représenté dans les histogrammes de la **Figure 3.37.** On y retrouve d'ailleurs, parmi les 3 VIP les plus importantes, les espèces bactériennes identifiées comme appartenant au groupe des *Bacillus cereus* (Bact10 et Bact15, **Figures 3.37.A et 3.37.B** respectivement), mais également les variables Bactn qui contribueraient plus à expliquer une autre classe que celle des fruits bio.

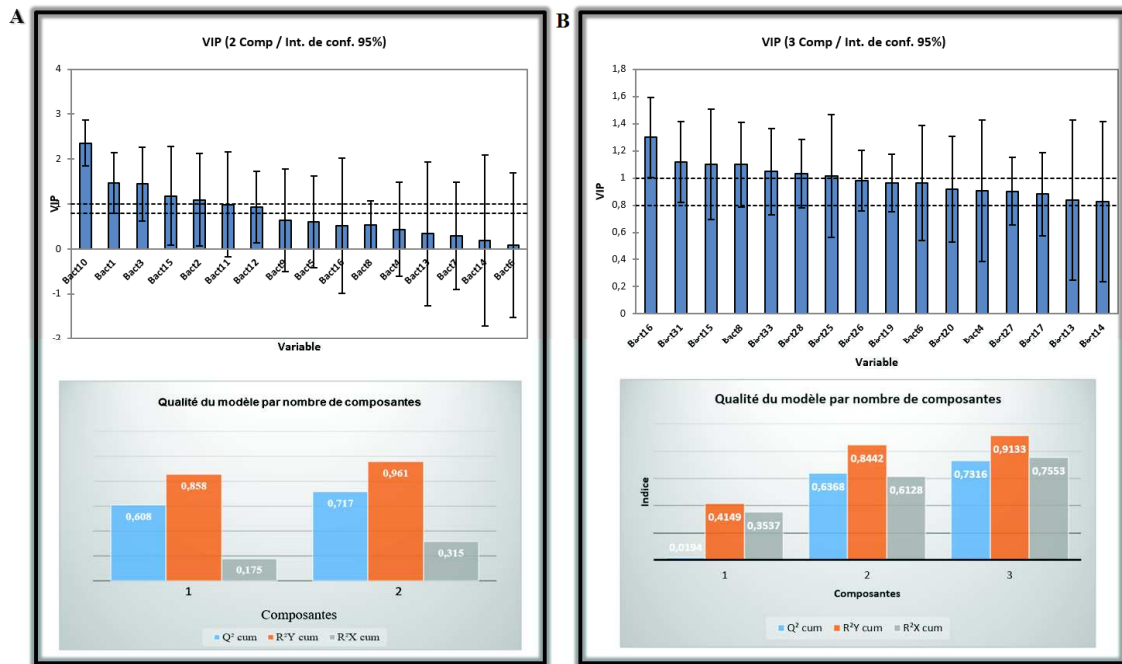


Figure 3.37. Analyse des données DGGE sur ADN bactériens par régression PLS.

L'importance des différentes variables X (VIP, Bactn) dans le modèle est représentée sur (A) la deuxième composante pour les nectarines et (B) la troisième composante pour les pêches.

Les histogrammes attestent de la qualité de nos deux modèles PLS.

L'application de notre approche sur les pêches et les nectarines issues de trois modes de production a permis de démontrer la robustesse de la PCR-DGGE pour la discrimination des fruits bio. Les différences observées au niveau de la flore fongique et de la flore bactérienne étaient en effet assez significatives pour conclure qu'elles étaient dues aux traitements appliqués aux pêches et nectarines, mais également à leur état de fraîcheur. Il a été constaté que cette discrimination était plus efficace à partir de fruits prélevés directement au verger. En effet, la conservation des fruits à 1°C a entraîné la non détection de certains marqueurs microbiens qui pouvaient être importants pour la discrimination. Au cours de la courte période post-récolte des fruits frais, des évolutions de la flore microbienne (et donc des empreintes génétiques microbiennes mesurées) peuvent avoir lieu. Ceci entraîne ainsi la possibilité de perdre nos marqueurs microbiens de discrimination. Cela souligne l'importance d'effectuer des études supplémentaires pour vérifier la persistance des marqueurs microbiens discriminants de la fourche de l'agriculteur à l'assiette du consommateur en tenant compte des itinéraires techniques post-récolte.

Les abondances et richesses fongiques et bactériennes ont également été évaluées par qPCR et HRM. Les profils HRM étaient indistinguables entre les fruits selon leur mode de production ou même selon leur variété (pêches vs nectarines). Mais en comparant les profils HRM fongiques avec ceux obtenus pour les pommes, on a constaté que ces profils sont très différents : un seul pic de fusion à Tm 89°C a été obtenu pour les pêches et les nectarines (données non présentées). Les profils bactériens étaient par contre très semblables à ceux des pommes (Tm située entre 84 et 85°C pour tous les fruits : pêches nectarines et pommes). La différence au niveau de la structure des populations fongiques d'un type de fruit à un autre serait donc plus nette comparé aux populations bactériennes.

Concernant les résultats obtenus par qPCR, les charges bactériennes étaient identiques entre les différents types de pêches et de nectarines (en moyenne 2,25E+06 copies/μL, **Tableaux 3.14. et 3.15.**). Pour ce qui est de la flore fongique, aucune différence significative n'a été relevée pour les pêches à l'inverse des nectarines où les fruits bio avaient une plus faible abondance fongique comparé aux conventionnels (3,19E+06 copies/μL pour les bio et 7,10E+06 copies/μL pour les conventionnels, **Tableaux 3.14. et 3.15.**). Il est cependant intéressant de noter que les nectarines durables n'ont pu être différenciées ni des nectarines bio ni des nectarines conventionnelles.

Tableau 3.14. Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

| | Bio | Conv | Durable |
|---------|------------|------------|------------|
| Bio | - | Oui | Non |
| Conv | Oui | - | Non |
| Durable | Non | Non | - |

L'absence de différence au niveau de l'abondance fongique mesurée sur les pêches bio et conventionnelles peut être liée au fait que la majorité de ces pêches provenaient de plateaux de la coopérative. De plus, il ne nous a pas été précisé si des traitements post-récolte avaient été appliqués sur les fruits conservés en plateaux. Par ailleurs, comme cela avait été observé sur les pommes, l'abondance fongique est 2 à 3 fois plus élevée sur les pêches et les nectarines par rapport à l'abondance bactérienne (**Tableau 3.15.**)

Tableau 3.15. Comparaison des charges (A) bactériennes et (B) fongiques (en nombre de copies du gène 16S ou 26S/ μ L) obtenues sur les pêches et les nectarines par qPCR.

| A | Fruit | Agriculture | Moyenne | Écart-type |
|-------------------|-------------------|----------------|----------|------------|
| | <i>Nectarines</i> | Bio* | 1,54E+06 | 6,14E+05 |
| | | Conv* | 2,94E+06 | 1,67E+06 |
| | | Durable | 1,56E+06 | 4,56E+05 |
| | <i>Pêches</i> | Bio | 2,06E+06 | 7,89E+05 |
| | | Conv | 2,77E+06 | 8,99E+05 |
| | | Durable | 2,62E+06 | 1,21E+06 |
| B | | | | |
| <i>Nectarines</i> | Bio* | 3,19E+06 | 2,70E+06 | |
| | Conv* | 7,10E+06 | 4,11E+06 | |
| | Durable | 4,21E+06 | 1,81E+06 | |
| <i>Pêches</i> | Bio | 7,23E+06 | 5,86E+06 | |
| | Conv | 7,33E+06 | 7,64E+05 | |
| | Durable | 6,83E+06 | 3,41E+06 | |

À la suite de ces différentes analyses qualitatives et quantitatives de la flore microbienne globale des pêches et des nectarines, d'autres tests ont été réalisés sur ces échantillons. En effet, il a été démontré dans les précédents chapitres qu'une analyse plus ciblée permettait d'effectuer plus efficacement la discrimination des fruits bio. L'hypothèse de la possibilité d'utiliser le groupe des *Bacillus cereus* pour discriminer les pêches et les nectarines bio, en s'affranchissant des autres marqueurs ADN bactériens, s'est alors posée, sachant que le *B. thuringiensis* est utilisé dans l'agriculture comme biopesticide. Les bandes ADN n'étant pas présentes sur les profils bactériens obtenus pour les échantillons conventionnels, nous avons dans un premier temps vérifié la présence d'espèces bactériennes appartenant au groupe des *Bacillus* dans les pêches et les nectarines conventionnelles avec des amorces ADN spécifiques à ce groupe. Il est ressorti de cette analyse que des espèces appartenant à ce groupe étaient présentes aussi bien sur les fruits bio que sur les conventionnels ou les durables. Puis, l'approche de **Park et al., (2007)** a été appliquée : elle consiste à utiliser une PCR multiplex en ciblant les gènes *gyrB* et *groEL* comme marqueurs génétiques pour la détection simultanée des espèces de *Bacillus*. Nous avons pour idée, une fois cette approche validée sur nos échantillons, d'utiliser la HRM pour pouvoir discriminer les *Bacillus* avec les courbes de fusion et voir s'il était possible d'obtenir des profils HRM différents en fonction du mode de production. Des essais d'optimisation de la PCR multiplex ont été réalisés mais sans succès. Il n'a donc pas été possible de poursuivre les analyses, mais il serait intéressant de pouvoir valider cette approche et vérifier l'hypothèse concernant les « profils HRM *Bacillus* » spécifiques à un mode de production donné.

3.4.2. Discrimination des bananes en fonction de leur mode de production

➤ Étude de l'empreinte génétique de la flore bactérienne des bananes

Notre approche a été testée sur des lots de bananes issues de deux origines géographiques différentes (Martinique et République Dominicaine), de deux variétés (CIRAD 925 et Cavendish) et prélevées durant deux années de récolte consécutives (pour les bananes de République Dominicaine). L'effet des différents facteurs sur la flore bactérienne des fruits a été testé et comparé.

Pour chaque banane étudiée, qu'elle provienne de Martinique ou de République Dominicaine, les codes-barres génétiques (profils de DGGE) correspondant à l'ADNr bactérien ont été comparés (**Figures 3.38. et 3.42.**). Il était intéressant de travailler sur les bananes de variété CIRAD 925 (Martinique) car les pratiques agricoles au champ sont différentes des bananes de variété Cavendish et se rapprochent des conditions de l'AB (**cf. partie 2.1.2.3.**).

Les ADN fongiques n'ont pas pu être amplifiés par PCR en quantité suffisante pour une analyse comparative par DGGE. Ceci pourrait être expliqué par l'engainage des régimes de bananes. L'engainage est une technique culturale utilisée pour limiter le grattage des fruits dû au frottement des feuilles et accélérer la croissance des bananes (**Jannoyer *et al.*, 1998**). Cette gaine créerait un microclimat avec des conditions de croissance qui seraient plus propices au développement des bactéries qui prendraient alors le dessus sur la flore fongique (levures et moisissures) pour qui le milieu deviendrait défavorable. Il est en effet possible qu'un phénomène de mycophagie bactérienne (**Leveau & Preston, 2008**) se soit mis en place au cours duquel les bactéries se seraient nourries des nutriments issus des champignons et aurait ainsi amené à la conversion de la biomasse fongique vers la biomasse bactérienne.

Dans cette partie, l'impact des traitements sur la flore bactérienne des bananes sera présenté dans un premier temps. Puis, les paramètres liés à la variété des bananes et leur origine géographique seront analysés séparément afin d'étudier leur influence sur la flore microbienne des fruits. L'effet de la position des bananes sur un même régime (en haut, au milieu et en bas), ou présentent sur une même parcelle mais prélevées sur plusieurs régimes, ne sera pas présenté. Aucune différence significative n'avait été relevée (la valeur de Q^2_{cum} ne dépassait pas 0,2 avec les différentes analyse de PLS-DA).

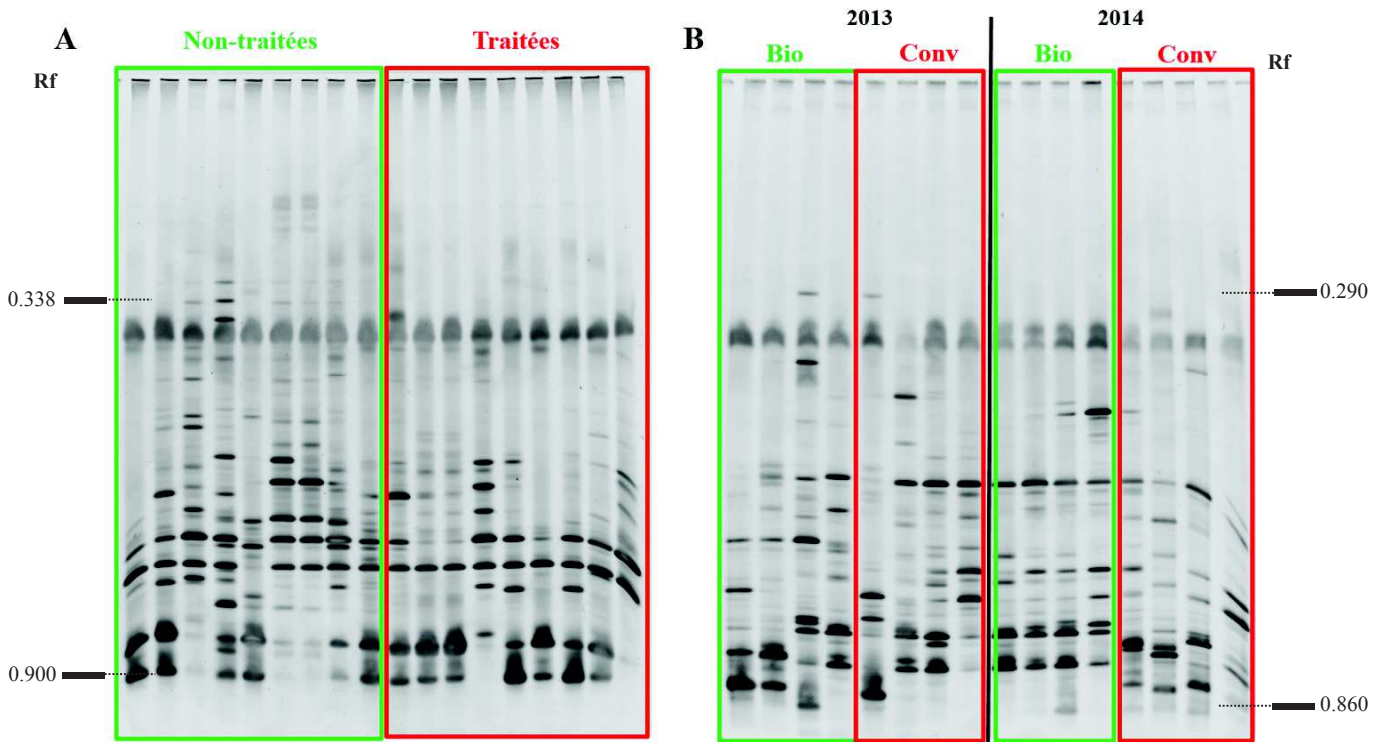


Figure 3.38. Profils DGGE d'ADNr bactériens (ADNr 16S) (A) de bananes Cavendish de Martinique et (B) de République Dominicaine, issues de différents modes de production.

L'aspect visuel des profils DGGE bactériens montrent de grandes variations de la structure des communautés bactériennes entre des bananes d'un même mode de production (**Figure 3.38.**). Ce constat peut être relevé aussi bien pour les bananes de Martinique (**Figure 3.38.A**) que pour les bananes de République Dominicaine de 2013 et de 2014 (**Figure 3.38.B**). Ceci suggère que les variations inter-fruits seraient mesurables. Les analyses ACP réalisées à partir des données de DGGE ont mis en évidence des tendances : les échantillons se regroupent en fonction d'un type d'agriculture donné mais sans permettre une dissociation qui soit significative entre les modes de production (**Figure 3.39.**). En effet, les composantes de l'ACP permettent de décrire uniquement 50% des variations de la flore bactérienne des bananes de Martinique (**Figure 3.39.A**) et 55% des variations la flore bactérienne des bananes de République Dominicaine (**Figure 3.39.B**). Ce regroupement est plus clair dans le cas des bananes de Martinique comparé à celles de République Dominicaine (**Figure 3.39.B**). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que deux paramètres sont pris en considération : « l'effet traitements » (bio vs conventionnels) et « l'effet année de récolte » (2013 vs 2014).

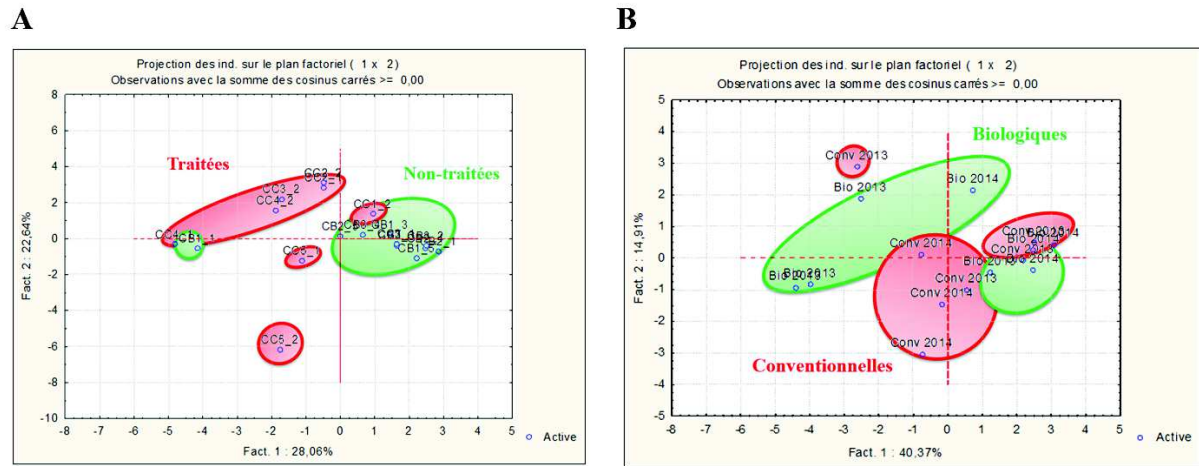


Figure 3.39. Analyses par ACP des profils bactériens (ADNr 16S) obtenus par analyse DGGE de bananes (A) de Martinique et (B) de République Dominicaine, issues de différents modes de production.

Les marqueurs ADN bactériens, qui permettraient d'établir une relation entre les profils DGGE bactériens et les bananes issues d'un type d'agriculture défini, semblent représenter de trop faibles variations relatives par rapport à la variation globale de l'ensemble des données. La méthode de PLS-DA apparaît donc à nouveau plus appropriée pour la discrimination des bananes bio ou « Non-traitées » (pas d'antifongique appliqué, les traitements ont été renseignés dans la **partie 2.1.3.**, les bananes de Martinique n'étaient pas certifiées bio) par PCR-DGGE. L'analyse PLS-DA a été appliquée à partir des données de la DGGE de la **Figure 3.38.** (abondance et richesse bactérienne). Les résultats de l'analyse de la PLS-DA sont illustrés dans la **Figure 3.40.** La dispersion des individus (ADN bactériens) et la dispersion des observations (échantillons issus d'un mode de production d'une année de récolte donnés) y sont représentées. La qualité du modèle et les bandes ADN les plus discriminantes (VIP) sont présentées dans la (**Figure 3.41.**).

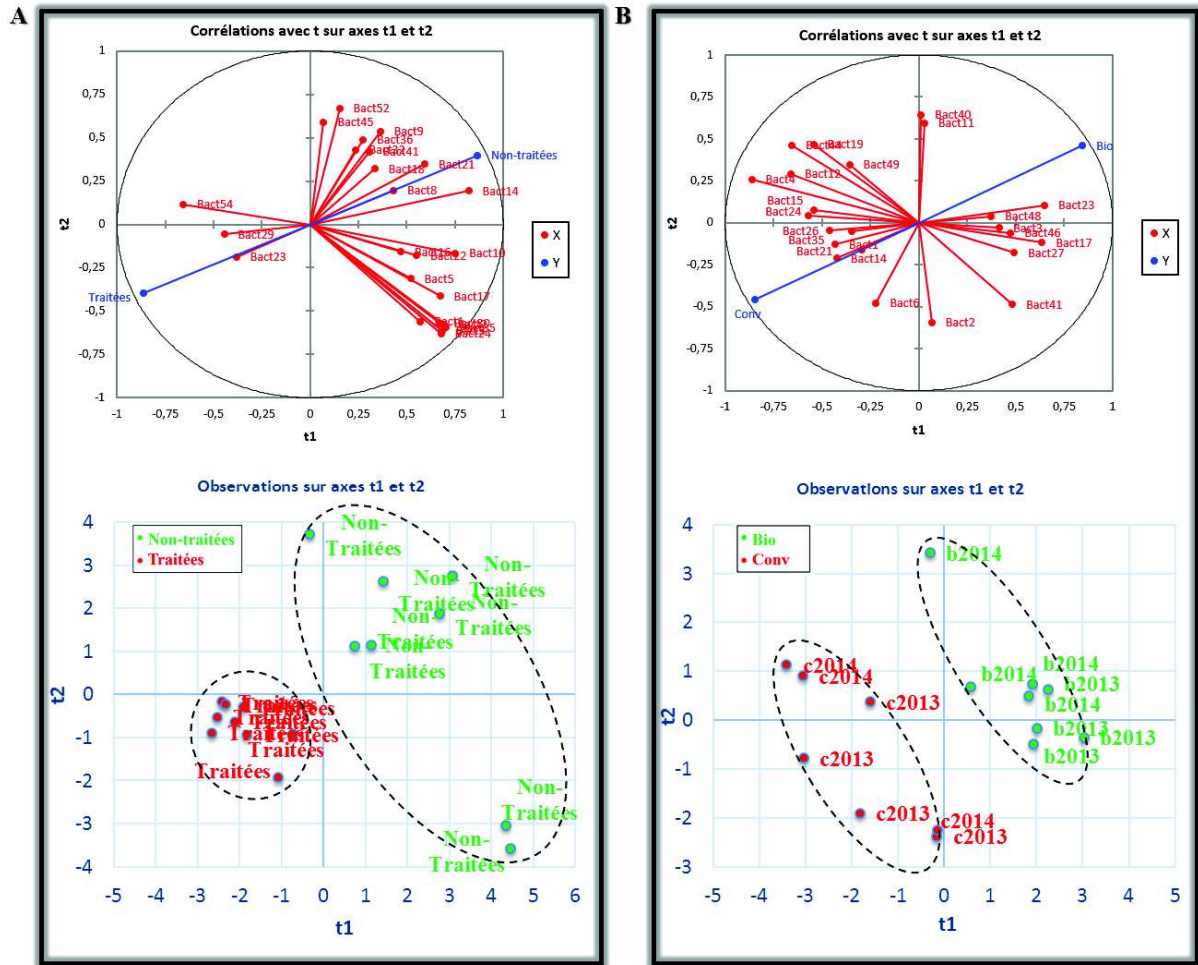


Figure 3.40. Graphiques des corrélations générées par l'analyse discriminante PLS.

Ces graphiques représentent les corrélations entre les variables X (Bactn*) et les variables Y du modèle (Traitées/Non-traitées et Bio/Conv) et la répartition des individus sur les axes t à partir des variables explicatives. à partir des données des bananes (A) de Martinique et (B) de République Dominicaine.

Dans les cercles de corrélation, les classes correspondant aux différents modes de production sont représentées en bleu et les variables quantitatives (X) en rouge.

*Bactn = Bactérie + numéro (ou bande du gel DGGE)

*b2013 ou b2014 = bananes bio de 2013 ou 2014

*c2013 ou c2014 = bananes conventionnelles de 2013 ou 2014

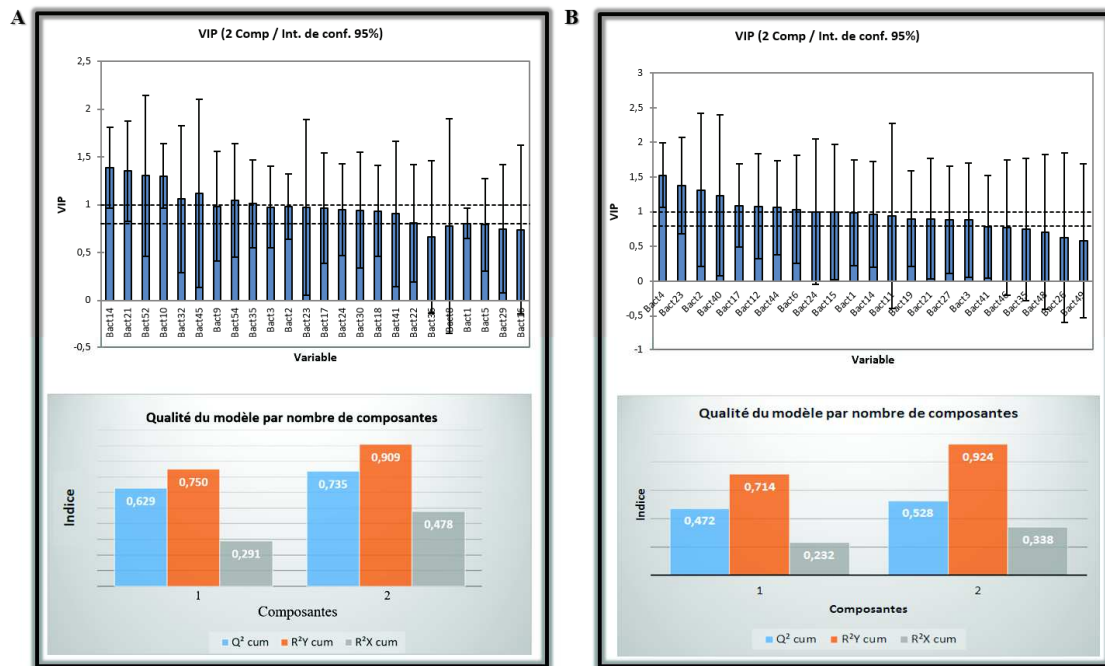


Figure 3.41. Analyse des données DGGE sur ADN bactériens par régression PLS.

L'importance des différentes variables X (VIP, Bactn) dans le modèle est représentée sur la deuxième composante pour les bananes (A) de Martinique et (B) de République Dominicaine.

Les histogrammes attestent de la qualité de nos deux modèles PLS.

La PLS-DA réalisée à partir des données des bandes ADN bactériennes les plus discriminantes (VIP) a permis d'obtenir des modèles très prédictifs (**histogrammes des Figures 3.41.A et 3.41.B**, avec R^2Y et Q^2cum respectivement supérieurs à 0,9 et 0,5 sur deux composantes). Ce résultat démontre que les informations fournies par ces marqueurs bactériens étaient partiellement masquées par la variabilité biologique naturelle des bananes (comme cela était le cas pour l'étude de la flore bactérienne des pêches, des nectarines et des pommes). Autrement dit, les variations des profils bactériens étaient trop importantes pour permettre une classification en utilisant l'information de l'ensemble des bandes bactériennes détectées par DGGE. En effet, les modèles ont été améliorés à hauteur de 10% par rapport à ceux qui ont été obtenus à partir de l'analyse de toutes les bandes bactériennes. En outre, une vingtaine de bandes bactériennes suffit pour réaliser la discrimination.

Les graphiques des corrélations de la **Figure 3.40**. permettent de constater que les bananes « traitées » (**Figure 3.40.A**) et les bananes « bio » (**Figure 3.40.B**) sont corrélées négativement avec leurs homologues respectifs (« Non-traitées » et « Conv »). De plus, certaines variables quantitatives (représentées en rouge et appelées « Bactn ») contribuent plus à « expliquer » une classe par rapport à d'autres. En effet, les variables (« Bactn ») permettent d'expliquer majoritairement la classe « Non-traitées » (21 variables « Bactn ») par

rapport à la classe « Traitées » (seulement Bact23, 29 et 54) dans le cas des bananes de Martinique (**Figure 3.40.A**). Pour autant, cela ne signifie pas qu'elles ne sont pas importantes pour la discrimination. Le graphique des VIP atteste d'ailleurs de l'importance de ces bandes dans notre modèle : par exemple, la bande ADN Bact54 est classée parmi les dix VIP les plus importants.

Pour les bananes de République Dominicaine, les variables explicatives sont réparties entre les classes « Bio » et « Conv » (**Figure 3.40.B**). Certaines ne contribuent pas plus à une classe plutôt qu'à une autre (cas de Bact2, 6, 11, 40 et 41 par exemple).

Ainsi, les bananes de Martinique et de République Dominicaine peuvent être différenciées en fonction de leur mode de production, qu'elles soient certifiées ou non. Les résultats de la matrice de confusion indiquaient que le taux de bons classements s'établissait à 100%. Les histogrammes représentant la "Qualité du modèle par nombre de composantes" (**Figure 3.41.**), indiquent que le modèle obtenu pour les bananes de Martinique est plus prédictif que dans le cas des bananes de République Dominicaine, avec des valeurs de Q^2 cum égales à 0,7 et 0,5 respectivement. Du fait que deux effets aient été testés dans un même modèle (**Figures 3.40.B et 3.41.B**), le pouvoir prédictif de ce dernier s'en est retrouvé réduit de 20% par rapport à un modèle ne tenant compte que de l'effet des traitements (données non présentées). Cela indique que l'année de récolte entraîne des variations non négligeables sur l'écosystème bactérien des bananes, mais que celles-ci sont moins importantes que celles induites par les traitements qui ont été appliqués sur les parcelles.

Par la suite, les variations observées sur la flore bactérienne liées aux modes de production ont été comparées à celles liées à l'origine géographique (Martinique vs République Dominicaine) et à la variété (Cavendish vs CIRAD 925). Il était important d'étudier les variations liées à la variété car les bananes Cavendish non-traitées aux fongicides sont cultivées sur la même parcelle que les bananes de variété CIRAD 925 (en Martinique), non-traitées aux fongicides également. Il a donc été possible de mesurer l'impact variétal en s'affranchissant complètement de l'effet des traitements appliqués aux fruits et de leur origine géographique (**Figure 3.42.A**). Par ailleurs, de précédentes études menées au sein de l'équipe ont déjà pu démontrer qu'il était possible de relier l'empreinte microbienne d'un aliment à son origine géographique (**Le Nguyen, 2008 ; El Sheikha et al., 2009 ; Tatsadieu et al., 2010 ; Duffossé et al., 2013**). Nos travaux démontrent qu'il est également possible de relier

l’empreinte microbienne d’un aliment à son mode de production. Il est donc intéressant de comparer l’impact de ces deux paramètres sur la flore microbienne des bananes (**Figure 3.42.B**) et de pouvoir déduire lequel est le plus influent.

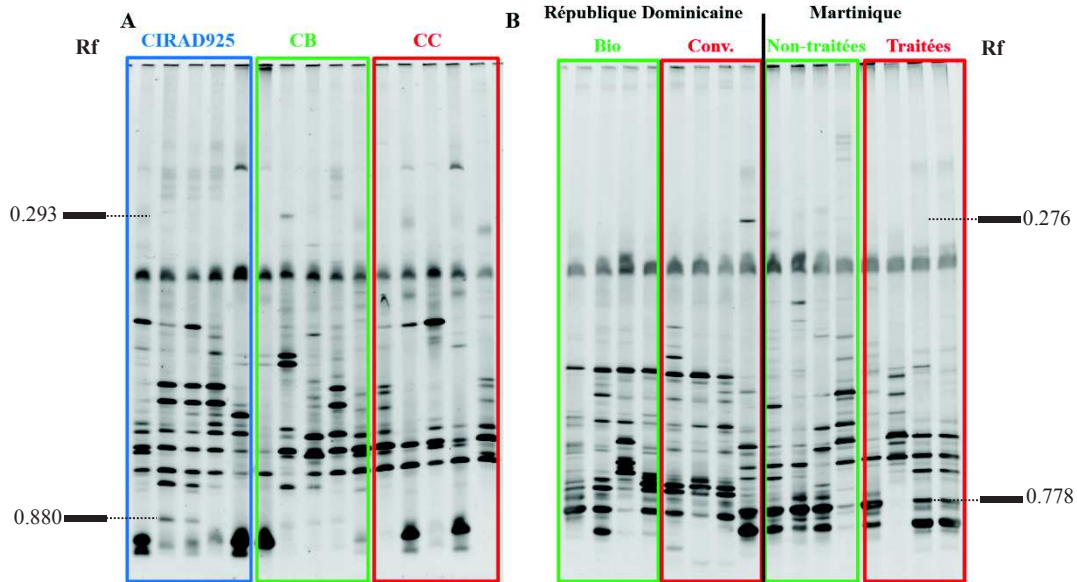


Figure 3.42. Profils DGGE d’ADNr bactériens (ADNr 16S) de bananes issues de différents modes de production.

(A) Comparaison de l’effet traitements avec l’effet variété à partir de bananes de Martinique, de variété Cavendish et CIRAD925 (CB = Cavendish non-traitées aux fongicides ou « biologique », CC = Cavendish traitées aux fongicides).

(B) Comparaison de l’effet traitement avec l’effet géographique à partir de bananes de Martinique et de République Dominicaine de variétés Cavendish.

La PLS-DA a été appliquée afin de vérifier si les paramètres liés à « l’effet géographique » et à « l’effet variété » pouvaient entraîner des variations plus importantes dans la structure des communautés bactériennes des bananes par rapport à « l’effet traitements » (**Figures 3.43.**). Pour l’étude de « l’effet variété », une sélection des variables les plus significatives pour le modèle a été réalisée en utilisant l’analyse des VIP. Les VIP ayant une valeur supérieure ou égale à 1 ont permis d’améliorer notre modèle et ont donc été conservées. Les autres ont été exclues du modèle. Avant d’effectuer cette sélection, la qualité de notre modèle (Q^2_{cum}) était très médiocre : l’indice Q^2_{cum} restait faible (0,4), même en augmentant le nombre de composantes. À partir de 2 composantes, la valeur de Q^2_{cum} diminuait. Cela suggère que la qualité de l’ajustement pouvait être très variable en fonction des bananes (CIRAD925 vs Cavendish), soulignant ainsi la nécessité de supprimer les variables X (Bactn) non-informatives. Cette sélection a d’ailleurs permis d’augmenter la qualité de notre modèle de 20% (la valeur de Q^2_{cum} est passée de 0,4 à 0,6) (**Figure 3.43.A**).

Cette sélection n'a pas été nécessaire pour l'étude de « l'effet géographique ». Le modèle obtenu était en effet très prédictif, avec $Q^2_{cum} = 0,7$ et $R^2Y = 0,9$ sans avoir à supprimer les données issues des bandes bactériennes non-VIP (**Figure 3.43.B**).

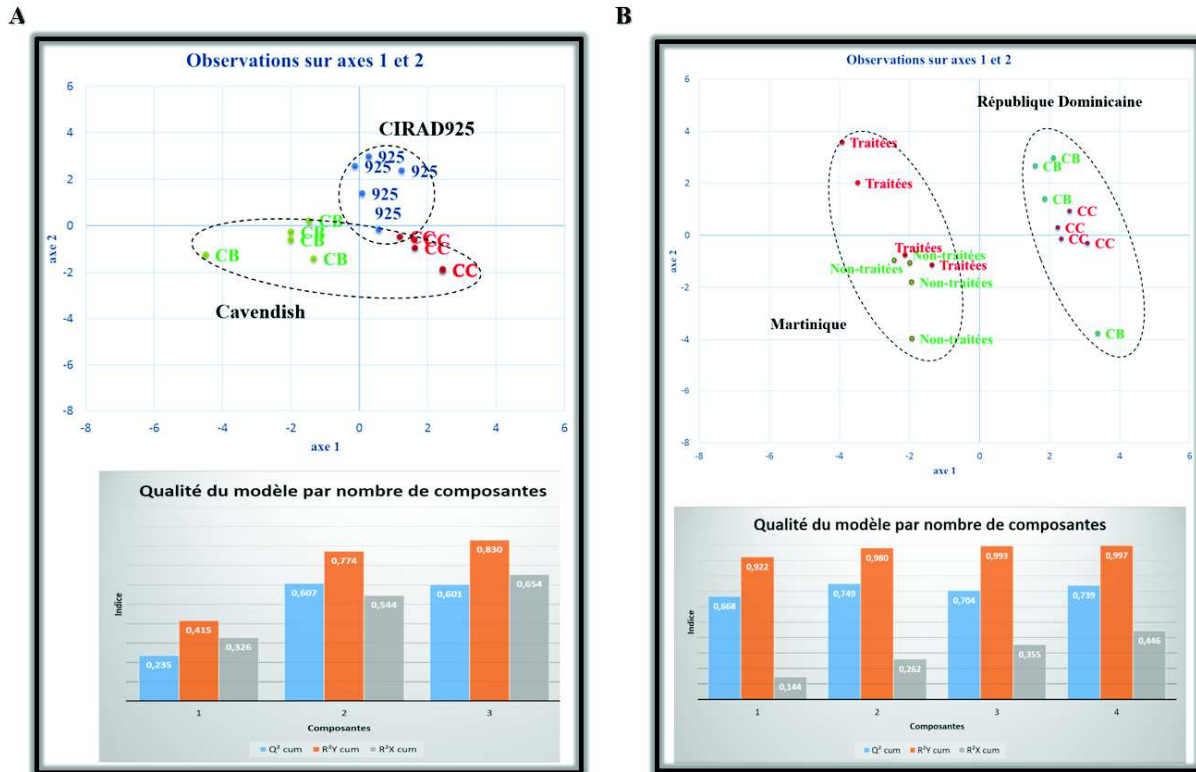


Figure 3.43. Analyse des données DGGE par régression PLS.

(A) Comparaison de « l'effet traitement » avec « l'effet variété » à partir de bananes de Martinique de variété Cavendish et CIRAD925 (CB = Cavendish non-traitées aux antifongiques, CC = Cavendish traitées).

(B) Comparaison de « l'effet traitement » avec « l'effet géographique » à partir de bananes de Martinique et de République Dominicaine de variétés Cavendish.

Les graphiques représentant la dispersion des échantillons (**Figure 3.43.**) informent que ces échantillons se regroupent en fonction de leur variété (**Figure 3.43.A**) ou de leur origine géographique (**Figure 3.43.B**). On constate également dans ces deux graphiques que les échantillons ont tendance à se regrouper en fonction de leur mode de production. En particulier dans la **Figure 3.43.A**, où les 3 groupes, « 925 » (variété CIRAD925), CB et CC (variété Cavendish dans les deux cas) se distinguent nettement les uns des autres bien que ce soit « l'effet variété » qui est mesuré. Cet effet entraîne des variations importantes de la flore bactérienne des bananes de Martinique ($R^2X = 0,6$) puisqu'il est possible de distinguer nettement les deux groupes « Cavendish » et « 925 » (**Figure 3.43A**). Cependant, ces variations se sont révélées être moins importantes par rapport à l'effet lié au mode de

production. En effet, lorsque les données décrivant le mode de production sont utilisées comme variables explicatives, le modèle est plus prédictif ($R^2X = 0,7$). Les bananes non traitées aux fongicides (925 et CB) se dissocient les unes des autres alors qu'elles proviennent du même mode de production.

La **Figure 3.43.B** permet d'étudier cette fois-ci l'impact de l'origine géographique sur la flore bactérienne des bananes par rapport à celui qui est lié au mode de production. Bien qu'il soit possible de relever une tendance des échantillons à se regrouper en fonction des 4 modes de production étudiées (« Traitées », « Non-traitées », CB et CC), on constate que la dissociation s'effectue majoritairement en fonction de l'origine géographique des bananes. Ce modèle obtenu est très prédictif (avec $Q^2cum = 0,7$ et $R^2Y = 0,9$). Ceci, sans avoir à supprimer les données issues des bandes bactériennes non-VIP contrairement à ce qui avait été précédemment effectué (**Figures 3.40. et 3.41.**). Ces résultats démontrent donc que l'origine géographique influence la flore bactérienne des bananes de manière plus significative que les traitements appliqués.

Les différents paramètres testés sur les bananes ont donc montré que certains pouvaient avoir davantage d'impact sur leur écosystème bactérien. Ainsi « l'effet traitements » a une influence mesurable et plus importante que la variété ou l'année de récolte sur cet écosystème (**Figures 3.40. et 3.41.**). Par contre l'origine géographique des bananes domine sur « l'effet traitements » (**Figure 3.43.B**).

Notre approche consistait à appliquer la méthode PCR-DGGE pour la discrimination des fruits en fonction de leur type d'agriculture. Cette approche a donc été validée sur des lots de bananes issues de deux origines géographiques différentes (Martinique et République Dominicaine), de deux variétés (CIRAD 925 et Cavendish) et prélevées durant deux années de récolte consécutives (pour les bananes de République Dominicaine). L'effet des différents facteurs sur la flore bactérienne des fruits a été testé et comparé. Il a ainsi été déduit que les traitements appliqués aux fruits entraînaient des variations majeures sur leur flore bactérienne et plus importantes que leur position dans la parcelle ou sur le régime, leur année de récolte et leur variété. Par contre, l'origine géographique influence de façon plus importante la composition de la flore bactérienne par rapport au mode de production. L'effet terroir serait donc un critère important à prendre en compte dans la mise en place d'un outil d'authentification des aliments bio. Il serait judicieux d'effectuer ces mesures sur d'autres types de fruits pour valider cette hypothèse.

De plus, l'écosystème microbien sous la gaine entourant les bananes semble être caractérisé par une forte dominance de la croissance des bactéries au détriment des levures et des moisissures dont l'empreinte génétique n'a pu être étudiée. Il en résulte une très faible proportion d'ADN fongique détectable et amplifiable à la surface des bananes par rapport aux ADN bactériens. Cette proportion a été estimée par qPCR. Il en ressortait que la flore bactérienne était 5 à 6 fois plus importante par rapport à la flore fongique pour les bananes récoltées en République Dominicaine (en moyenne $2,8 \cdot 10^7$ copies du gène cible 16S/ μ L contre $5 \cdot 10^6$ copies du 26S/ μ L) **Tableau 3.16.**

Tableau 3.16. Comparaison des charges bactériennes et fongiques (en nombre de copies du gène 16S ou 26S/ μ L) obtenues sur les bananes par qPCR.

| Localisation | Année | Variété | Agriculture | Abondance fongique | | Abondance bactérienne | |
|-------------------|-------|-----------|-----------------|--------------------|------------|-----------------------|------------|
| | | | | Moyenne | Écart-type | Moyenne | Écart-type |
| <i>Martinique</i> | 2013 | CIRAD925 | « Non-traitée » | 3,28E+06 | 1,28E+06 | 2,25E+08 | 1,27E+08 |
| | | Cavendish | | 5,03E+06 | 8,44E+05 | 2,05E+08 | 1,63E+08 |
| | | Cavendish | « Traitée » | 3,16E+06 | 9,17E+05 | 3,01E+08 | 1,32E+08 |
| <i>Rep. Dom.</i> | 2013 | Cavendish | Bio | 8,12E+06 | 6,94E+06 | 3,37E+07 | 1,83E+07 |
| | | | Conv | 3,94E+06 | 4,57E+06 | 2,83E+07 | 2,33E+07 |
| | 2014 | | Bio | 5,75E+06 | 4,05E+06 | 3,77E+07 | 2,73E+07 |
| | | | Conv | 2,29E+06 | 1,77E+06 | 1,49E+07 | 1,55E+07 |

*Bio = Biologique *Conv = Conventiionnelle

Dans le cas des bananes de Martinique cette différence était encore plus importante : 60 fois plus d'ADN bactérien (en moyenne $2,4 \cdot 10^8$ copies/ μ L) que d'ADN fongique (levures/moisissures) (en moyenne $3,8 \cdot 10^6$ copies/ μ L) ont été retrouvés sur ces fruits. En outre, lorsque l'on compare ces quantités avec celles qui ont été observées sur les autres fruits étudiés (pommes, pêches et nectarines), on constate que l'abondance bactérienne est bien plus importante sur les bananes (en particulier sur celles provenant de Martinique) (**Tableaux 3.8., 3.11., 3.15. et 3.16.**). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été relevée au niveau de l'abondance bactérienne entre les différentes bananes de l'étude, ou au niveau de leur abondance fongique. À l'exception des bananes « non-traitées » (CB) de Martinique dont l'abondance fongique est significativement plus importante ($5,03E+06$ copies/ μ L) (**Tableaux 3.16. et 3.17.**).

Tableau 3.17. Différences significatives obtenues entre les groupes selon le test de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner réalisé à partir des données obtenues par qPCR sur ADN fongiques (26S).

| | CIRAD925 | CB | CC |
|----------|----------|-----|-----|
| CIRAD925 | - | Oui | Non |
| CB | Oui | - | Oui |
| CC | Non | Oui | - |

*CB = Cavendish non-traitées aux antifongiques, CC = Cavendish traitées.

L'analyse de l'abondance microbienne a donc démontré qu'il était possible de mesurer des différences significatives selon les types de bananes. L'analyse de la richesse microbienne par HRM a également permis de mettre en évidence des résultats intéressants. En effet, les profils HRM bactériens n'ont pas présenté de différences entre les bananes selon leur mode de production, leur variété ou l'année de culture (un seul pic de fusion à 85°C pour toutes les bananes). Concernant les profils HRM fongiques, le même constat a été fait pour les bananes de République Dominicaine à l'inverse des bananes de Martinique où l'allure des courbes et les Tm étaient significativement différents entre les types de bananes (Cavendish vs CIRAD 925 et non-traitées vs traitées) (**Figure 3.44.**).

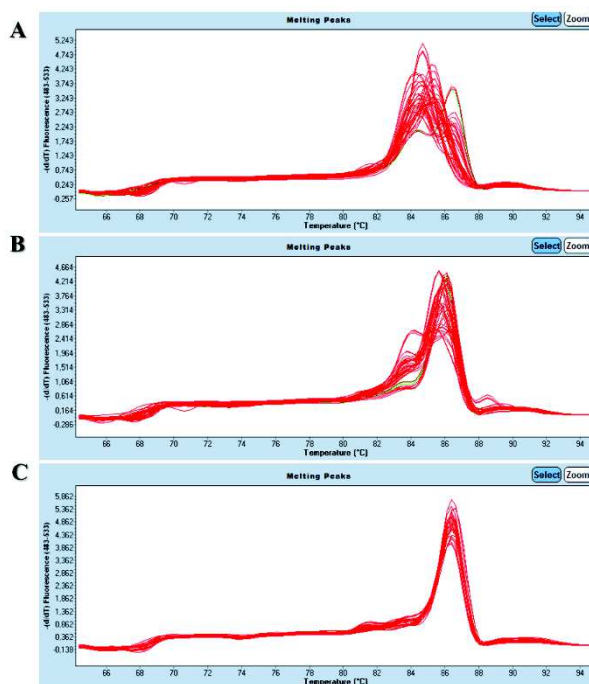


Figure 3.44. Courbes de fusion obtenues par HRM pour l'analyse de la richesse fongique présente à la surface des bananes (A) CIRAD925 (B) CB et (C) CC.

*CB = Cavendish non-traitées aux antifongiques, CC = Cavendish traitées.

3.4.3. Conclusion

Pour conclure sur ce dernier chapitre, les résultats obtenus pour l'étude de la flore bactérienne et de la flore fongique présentes à la surface de bananes, pêches et nectarines confirment ceux qui ont été obtenus pour les pommes : les modes de production ont une influence significative sur les microorganismes présents à la surface des fruits que l'on peut mesurer. Cet impact peut être mesuré à l'aide de l'analyse globale des flores bactériennes et fongiques. L'application de notre approche sur différents types de fruits a également fait ressortir le besoin de sélectionner des groupes microbiens et de s'affranchir de ceux qui entraînaient un biais, en particulier les groupes bactériens. Les analyses statistiques (PLS-DA) des données DGGE ont confirmé l'importance de ces groupes microbiens pour la discrimination des fruits en fonction de leur type d'agriculture et l'intérêt d'effectuer une analyse plus ciblée de la flore microbienne. De plus, même si les données des températures de fusion obtenues après HRM ne nous ont pas permis de discriminer les fruits selon leur mode de production, elles nous ont cependant permis de constater que les profils pouvaient varier d'un type de fruit à un autre (données non présentées). En effet, l'aspect global des courbes de fusion était différent entre ces fruits, en particulier dans le cas des empreintes HRM fongiques.

Ainsi, le mode de culture n'est pas le seul déterminant dans la présence de certains groupes microbiens. Le type de fruit est aussi important pour comprendre la présence de ces derniers en plus de leur origine géographique, leur variété ou de leur état de fraîcheur (durée de stockage après récolte et analyse). L'ensemble de ces paramètres doit donc être pris en compte pour pouvoir réaliser efficacement l'authentification d'aliments issus de l'AB.

Par ailleurs, bien que la flore bactérienne présente de très grandes variations, qualitatives (DGGE/HRM) et quantitatives (qPCR), et qu'il est nécessaire de rechercher les espèces discriminantes pour pouvoir réaliser l'analyse, il semble plus judicieux d'utiliser aussi bien l'analyse de la flore fongique et de la flore bactérienne pour pouvoir discriminer efficacement les aliments bio des conventionnels. En effet, même si l'utilisation de la flore fongique présentait moins de difficulté pour la discrimination comparé à la flore bactérienne, cette dernière a été nécessaire pour pouvoir discriminer les bananes par PCR-DGGE puisque les quantités d'ADN fongiques étaient insuffisantes. Dans tous les cas, il a été possible de discriminer les fruits bio des fruits conventionnels avec l'étude de ces deux types de microorganismes.

4. Conclusion générale et perspectives

-
-
-



4. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'engouement des consommateurs pour des produits sains, naturels, sans risque pour leur santé et l'environnement, et la demande constante de l'amélioration des contrôles alimentaires a entraîné les scientifiques à se pencher davantage sur le développement d'outils analytiques fiables pour garantir la traçabilité et l'authenticité des aliments et lutter contre la fraude alimentaire. C'est dans ce contexte que s'est inscrit notre travail de recherche, afin de proposer une méthodologie permettant de contrôler l'authenticité des aliments issus de l'AB, qui sont parmi les plus touchés par la fraude en Europe. La finalité de ce projet étant de servir de base à la création d'outils d'authentification des aliments bio, dans le but d'aider et d'accompagner les organismes de contrôle, ainsi que d'apporter des connaissances supplémentaires sur la flore microbienne associée à ce type d'aliment. La littérature nous offre en effet quelques outils pour authentifier les aliments bio mais ces approches font souvent appel à des méthodes physico chimiques ou isotopiques qui sont longues et coûteuses à mettre en place. Aucune ne propose d'utiliser la flore microbienne naturelle des aliments pour les discriminer en fonction de leur mode de production. Sachant aussi que très peu d'études ont investigué la flore microbienne des aliments bio (**Ottesen *et al.*, 2009 ; Leff *et al.*, 2013 ; Bigot *et al.*, 2015**).

L'application de la méthode moléculaire d'empreintes génétiques PCR-DGGE, combinée à des outils statistiques a permis de répondre à nos premières questions de recherche « *Les traitements agricoles appliqués au champ influencent-ils l'écosystème microbien des aliments ?* », « *Est-il possible de mesurer l'impact des pratiques agricoles sur la flore microbienne des aliments ?* ». L'utilisation de la PCR-DGGE dans notre contexte de recherche était justifiée par le fait que cet outil a été largement employé pour l'étude de communautés microbienne issues d'aliments variés (**Albano *et al.*, 2008 ; Le Nguyen *et al.*, 2008 ; El Sheikha *et al.*, 2009 ; Durand *et al.*, 2012 ; Arcuri *et al.*, 2013 ; Hamdouche *et al.*, 2015**), notamment à des fins d'authenticité et de traçabilité (origines géographiques). Nos premières analyses ont démontré qu'il existe une signature spécifique du mode de production permettant de différencier significativement les fruits en fonction du type d'agriculture dont ils étaient issus.

Nous avons ensuite cherché à comprendre à quel niveau il était possible d'expliquer les différences observées entre les flores microbiennes des fruits bio des autres types de fruits (durables/conventionnels par exemples). La combinaison de méthodes de biologie moléculaire variées nous a permis d'avoir une vision exhaustive de leur communauté microbienne et de déduire que la discrimination pourrait être réalisée sans nécessité d'analyser la totalité de la microflore présente. Par ailleurs, il a été constaté en utilisant une méthode d'amplification d'ADN par PCR quantitative (qPCR) que l'abondance, ou charge fongique était plus importante sur les fruits issus de l'AB. Il a également été détecté une variation quantitative entre la charge mesurée sur deux fruits provenant d'une même parcelle, aussi bien en termes bactériens que fongiques. En effet, l'abondance microbienne varie significativement d'une pomme à une autre. Cette variation a également été observée d'un point de vue qualitatif par PCR-DGGE pour l'étude des communautés bactériennes. Cette variation observée souligne ainsi l'intérêt de définir un lot authentifiable et de ne pas se baser sur l'analyse d'un seul et unique fruit pour pouvoir déterminer son mode de production.

La robustesse de notre méthodologie a ensuite été testée en l'appliquant sur plusieurs fruits (pommes, pêches, nectarines, bananes) issus de l'AB et conventionnelle. D'autres paramètres ont également été testés : effet intra-parcellaire, effet de la variété, effet de l'année de récolte et effet de l'origine géographique. Il a ainsi été déduit que les traitements appliqués aux fruits entraînaient plus de variation sur leur flore bactérienne que la variété des fruits, leur année de récolte et leur localisation dans la parcelle ou dans l'arbre. Par contre, l'origine géographique influence de façon plus importante la composition de la microflore par rapport au mode de production. L'effet terroir est donc un critère important à prendre en compte dans la mise en place d'un outil d'authentification des aliments bio.

L'analyse par séquençage des bandes ADN obtenues après DGGE (16S et 26S) et les analyses par métagénomique (16S) sur les échantillons de pommes nous ont permis de répondre à la question « *Existe-t-il des marqueurs microbiens discriminants qui permettraient d'assurer d'authentifier les aliments bio ?* ». L'ensemble des résultats a permis de constater que ces communautés microbiennes étaient très riches et étaient constituées de plusieurs groupes taxonomiques, parmi lesquels on a pu identifier les groupes les plus discriminants. Les données montrent qu'il n'y aurait pas de marqueurs spécifiques du bio mais plutôt des marqueurs microbiens de discrimination appartenant soit au groupe conventionnel soit au groupe bio. L'utilisation de ces deux types de groupe serait plus

efficace pour réaliser la discrimination des fruits bio que la seule utilisation de groupes microbiens du bio. Les groupes fongiques discriminants étaient en majorité constitués d'espèces phytopathogènes appartenant aussi bien à la division des *Basidiomycètes* que celle des *Ascomycètes*. Quant aux bactéries, les *Protéobactéries*, les *Bactéroidetes*, les *Actinobactéries* et les *Firmicutes* sont parmi les principaux groupes bactériens qui permettent la discrimination des pommes bio des pommes conventionnelles. Les analyses statistiques (par PLS-DA) ont permis de confirmer l'importance de ces groupes microbiens pour la discrimination des fruits en fonction de leur type d'agriculture et l'intérêt d'effectuer une analyse plus ciblée de la flore microbienne.

Gardons cependant à l'esprit l'aspect exploratoire, et très certainement encore incomplet, de nos analyses qui ne concernent ici qu'un seul marqueur d'ADN bactérien (16S) et qu'un seul marqueur d'ADN fongique (26S). De plus, lorsque l'interprétation des analyses des communautés microbiennes est basée sur les marqueurs moléculaires, il est important de se rappeler que l'abondance de marqueurs génétiques dans les extraits d'ADN génomiques ne reflète pas la biomasse réelle des échantillons et peut entraîner une sous-évaluation de la diversité apparente et des biais liés à l'interprétation de l'intensité des bandes ADN DGGE ou de l'abondance microbienne mesurée par qPCR. Certains biais étant inhérents à l'amplification par PCR qui va privilégier l'amplification des séquences ADN majoritaires et des séquences ADN plus facilement amplifiables dans une communauté microbienne complexe (Casamayor *et al.*, 2000). Le nombre de copies d'ADNr 16S/26S, la formation de chimères ou d'hétéroduplex peuvent également engendrer des biais dans l'interprétation des résultats. De même, la récupération des cellules microbiennes ainsi que les étapes de lyse cellulaire sont des étapes très importantes à optimiser. L'efficacité de sélection de marqueurs microbiens discriminants nécessite en effet des méthodes de récupération des microorganismes et d'extraction d'ADN qui soient robustes et optimales. Par ailleurs, plus ces étapes seront efficaces, plus la variabilité inter-fruits pourra être cernée. Il faudrait donc vérifier que la méthode de récupération des microorganismes à la surface des fruits est suffisamment efficace en l'analysant par microscopie électronique à balayage et tester des méthodes de lyse plus drastiques pour récupérer un maximum d'ADN microbien (spores, biofilms...).

Nous sommes également conscients que les facteurs qui ont été étudiés durant cette étude sont des paramètres que nous avons « figés » et qu'il existe de nombreux autres facteurs

à exploiter (effet du changement climatique, de la pollution, des saisons...). En outre, nous avons pu mettre en évidence que les types d'agriculture ont une influence mesurable sur la flore microbienne des aliments et que les fongicides semblent être les traitements qui seraient les plus impliqués. Mais il reste à vérifier quel traitement apporté par l'Homme est le plus influant, à quelle dose ou si c'est une influence combinée. Il faudrait pour cela prolonger nos études sur des parcelles de recherche parfaitement maîtrisées.

Néanmoins, comme cela avait été précisé, nos analyses corroborent les résultats de travaux antérieurs ayant investigué la flore bactérienne de fruits (**Ottesen *et al.*, 2009 ; Leff *et al.*, 2013**), démontrant ainsi la robustesse de ces études et l'intérêt de les poursuivre pour aboutir à la mise au point d'un outil basé sur l'analyse ADN (selon la demande, de type puces à ADN, NGS ou qPCR/HRM multiplexes par exemples) pour la discrimination des aliments bio. D'un point de vue général, les recherches scientifiques ont permis la mise en place d'un large éventail de méthodes analytiques pour l'authentification des aliments. L'utilisation de plusieurs types de marqueurs (isotopiques, métabolomiques et protéomiques principalement) est particulièrement adaptée lorsqu'ils sont combinés avec des analyses statistiques multivariées pour l'authentification, étant donné la quantité de paramètres pouvant influencer les données (origine géographique, pratiques agricoles dépendant du producteur, environnement...). En effet, les connaissances actuelles sur le sujet montrent qu'il est peu probable qu'une authentification soit fiable lorsqu'on utilise un seul marqueur ou un seul type d'outil analytique, quel que soit le produit étudié (végétal, animal, bio ou conventionnel...) (**Capuano *et al.*, 2012**). De plus, bien que la production bio dans l'UE soit harmonisée et en cours d'harmonisation avec la production bio des États-Unis, les normes de production bio peuvent varier dans d'autres pays du monde. De manière analogue, l'agriculture conventionnelle peut englober des stratégies de fertilisation et de contrôle des ravageurs nombreuses et variées. Le succès des approches analytiques peut varier en conséquence. Il serait alors intéressant d'approfondir ces analyses en utilisant plusieurs marqueurs universels complémentaires et plusieurs approches différentes.

Si nos travaux réalisés sur les espèces microbiennes présentent à la surface des fruits en tant que marqueurs de discrimination doivent être approfondis pour clairement identifier les groupes bactériens et fongiques nécessaires à cette discrimination, ils ont d'ores et déjà permis de mettre en évidence certains groupes d'intérêt. Il serait intéressant de vérifier si ces groupes sont universels, autrement dit retrouvés également sur d'autres variétés de pommes et

sur d'autres fruits. La composition de la communauté microbienne semble en effet varier selon le type de fruit : les profils DGGE et HRM étaient différents et les VIP ne contribuaient pas de la même façon à la discrimination. Autrement dit, les VIP pouvaient contribuer plus fortement à l'explication d'une classe plutôt qu'une autre (bio vs conventionnelle vs durable) ou avoir une contribution similaire. Cela dépendait du fruit étudié (pommes, pêches, nectarines ou bananes). Ces constats nous amènent à nous poser d'autres questions pouvant être étudiées lors de futures recherches : Est-il possible d'identifier des groupes discriminants communs aux fruits ? Ou faudra-t-il mettre au point un outil de discrimination spécifique à un fruit ou d'un terroir bien défini ?

La question de la pérennité des marqueurs microbiens d'authentification tout au long de la chaîne alimentaire peut également être posée et étudiée. En effet, au cours des étapes post-récolte, les changements d'empreintes génétiques microbiennes peuvent encore avoir lieu entraînant ainsi la possibilité de perdre nos marqueurs microbiens de discrimination.

Le modèle PLS-DA qui a été construit durant cette thèse, avec notamment les données de DGGE, est une étude de faisabilité qui donne des résultats très prometteurs mais ne constitue en aucun cas un modèle définitif. Il reste à valider notamment en vérifiant s'il est transposable. Comme tous les outils utilisés, par exemple en chimométrie, ils n'ont de sens qu'après validation. L'idéal aurait été de valider notre modèle avec des échantillons issus d'analyses indépendantes. Cela restera difficile à réaliser puisque tous les microorganismes retrouvés par analyse DGGE ne peuvent pas être identifiés. Il reste donc à montrer qu'il est possible de faire correspondre les bandes ADN des gels entre le lot d'étalonnage et le lot de validation. De plus, le nombre d'échantillons qu'il est possible d'étudier par analyse DGGE reste limité à une quinzaine d'échantillons.

L'analyse statistique par PLS-DA nous a permis de trouver certains groupes microbiens discriminants que nous pourrions, *a priori*, suivre comme indicateurs après identification. Mais, à ce jour, la majorité des méthodes reste au stade d'outils potentiels, elles nécessitent d'être validées sur de grands nombres d'échantillons pour être utilisées en routine. Un des enjeux majeurs pour le futur est de construire des bases de données largement ouvertes agrégeant les données disponibles sur les marqueurs authenticité des aliments bio (isotopiques, microbiens etc...).

D'autres perspectives de recherche sont ouvertes suite à ce travail. Par exemple, il serait intéressant d'établir un lien entre la composition et la fonction des communautés microbiennes identifiées. En effet, les méthodes utilisées dans cette thèse ont permis de caractériser les communautés microbiennes mais apportent peu de renseignements sur le rôle de ces microorganismes dans l'écosystème des fruits. Une meilleure compréhension de cette flore permettrait de savoir à quel moment les pathogènes du fruit apparaissent et s'il est possible de prévenir cette contamination assez tôt et avant que les symptômes n'apparaissent afin d'éviter une utilisation excessive de fongicides, bactéricides et limiter ainsi les pertes alimentaires en caractérisant également les antagonistes microbiens naturels. Cela permettrait ainsi de favoriser l'utilisation de systèmes de détection et de prévention pour une lutte raisonnée contre les pathogènes des fruits.



Publications dans des revues à facteur d'impact et chapitres d'ouvrage

- ✚ **Céline Bigot**, Jean-Christophe Meile, André Kapitan and Didier Montet. Discriminating organic and conventional foods by analysis of their microbial ecology: An application on fruits. *Food Control*. Volume 48, February 2015, Pages 123–129.
- ✚ **Céline Bigot**, Jean-Christophe Meile, Fabienne Remize and Caroline Strub. Applications of Metagenomics to Fermented Foods. Editors: Didier MONTET and Ramesh C. RAY (2015). Food Biology series, Science Publishers/CRC Press, USA. Microorganisms and Fermentation of Traditional Food Fermentations, Volume 2.
- ✚ **Céline Bigot**, Jean-Christophe Meile and Didier Montet. Discrimination of organic and conventional foods: fingerprinting approaches as a tool for authentication. Editors: Didier MONTET and Ramesh C. RAY (2016). Food Biology series, Science Publishers/CRC Press, USA. Food Traceability and Authenticity: Emerging Analytical Techniques. *En préparation 2016*.
- ✚ **Céline Bigot**, Sébastien Cavaignac, André Kapitan, Didier Montet and Jean-Christophe Meile. Study and characterization of microbial ecosystem on organic and conventional apples: towards the identification of microbial markers for authentication purposes. *En cours d'écriture pour le journal « Applied and Environmental Microbiology »*.
- ✚ **Céline Bigot**, Christophe Bugaud, André Kapitan, Didier Montet and Jean-Christophe Meile. What is the impact of the mode of production on the structure of microbial community of fruits? Application of a robust approach on bananas. *En cours d'écriture pour le journal « Food Control »*.

Communications orales présentées lors de congrès internationaux

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Discrimination of organic foods from conventional foods by analysis of the microbial ecology: An application on nectarines fruits. Prague (République Tchèque), Novembre 2013, RAFFA2013: 6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis.

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Sébastien Cavaignac, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Comparative analysis of the microbial ecology of organic and conventional foods. Belfast (UK), Avril 2014, ASSET2014: 2nd International Symposium on food integrity & traceability.

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Sébastien Cavaignac, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. The use of microbial flora analytical tools for the discrimination of organic foods. Cardiff (UK), April 2015, IAFP2015: International Symposium on food Safety.

Posters présentés lors de congrès internationaux et nationaux

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Sébastien Cavaignac, Jean-Christophe Meile, Christophe Bugaud, José Efrain Camilo, André Kapitan & Didier Montet. Authentication of pre-harvest food processing (organic vs conventional) by analysis of microbial communities. Bilbao (Spain), March 2015, 2nd Food Integrity Conference.

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Différenciation de fruits issus de l'Agriculture Biologique et conventionnelle par analyse de leur écologie microbienne. Tours (France), Novembre 2013, DinABio2013 : Colloque national sur les recherches en Agriculture Biologique.

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Laurent Berthiot, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Comparative analysis of microbial ecology of organic and conventional coffees. Montpellier (France), Novembre 2013, Les rencontres Qualiméditerranée 2013 : la sûreté alimentaire.

- 🇫🇷 **Céline Bigot**, Sébastien Cavaignac, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Comparative analysis of the microbial flora of organic and conventional fruits. In : La Journée de l'École Doctorale SPSA, juin 2014, Montpellier, France.

Autres

1. Présentations orales

- Céline Bigot, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Identification de marqueurs discriminants pour assurer la traçabilité et le contrôle sanitaire des produits alimentaires. 2013. In : Séminaire action 3 UMR Qualisud CIRAD, Janvier 2013, Montpellier (France).

- Céline Bigot, Jean-Christophe Meile & Didier Montet. Discrimination des fruits bio des fruits non bio par analyse comparative de leur flore microbienne. 2015. In : La Journée de l'École Doctorale SPSA, 19 juin 2015, Montpellier, France, Résumé, 1 p.

2. Articles de vulgarisation

- Publication sur le site du Cirad, rubrique « Nos recherches »
« **Produits bio ou produits non bio : l'analyse de leur flore microbienne permet de trancher** »
<http://www.cirad.fr/nos-recherches/resultats-de-recherche/2015/produits-bio-ou-produits-non-bio-l-analyse-de-leur-flore-microbienne-permet-de-trancher>

« **Organic or conventional products: discriminating by analysing their microbial ecology** »
<http://www.cirad.fr/en/research-operations/research-results/2015/organic-or-conventional-products-discriminating-by-analysing-their-microbial-ecology>

- Article pour un média web en environnement, écologie, nature et sciences de la Terre : notre-planete.info.
« **Comment détecter si des fruits et légumes sont vraiment bio ?** »
<http://www.notre-planete.info/actualites/4286-detecter-produit-bio>



Annexe 1 : Séquences d'ADN synthétiques de *Escherichia coli* et de *Saccharomyces cerevisiae* (GeneCust, Luxembourg)

[] = portion d'ADNr 16S/26S où s'hybrident les amorces 338F/518R pour *E. coli* ou NL1F/LS2R pour *S. cerevisiae* (voir **Tableau 2.9** pour des précisions sur les amorces)

>gi|699781435|gb|KM198100.1| *Escherichia coli* strain M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT GGG GAA TAT TGC ACA ATG GGC GCA AGC
CTG ATG CAG CCA TGC CGC GTG TAT GAA GAA GGC CTT CGG GTT GTA AAG
TAC TTT CAG CGG GGA GGA AGG GAG TAA AGT TAA TAC CTT TGC TCA TTG
ACG TTA CCC GCA GAA GAA GCA CCG GCT AAC TCC GTG **CCA GCA GCC GCG**
GTAAT

>gi|169125887|gb|EU441887.1| *Saccharomyces cerevisiae* strain VI2 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA GAA ACC AAC CGG GAT TGC CTT AGT
AAC GGC GAG TGA AGC GGC AAA AGC TCA AAT TTG AAA TCT GGT ACC TTC
GGT GCC CGA GTT GTA ATT TGG AGA GGG CAA CTT TGG GGC CGT TCC TTG
TCT ATG TTC CTT GGA ACA GGA CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC CGT GTG
GCG AGG AGT GCG GTT CTT TGT AAA GTG CCT TCG AA**G AGT CGA GTT GTT**
TGG GAA T

Annexe 2 : Les principaux champignons phytopathogènes

(González-Fernández *et al.*, 2010).

| Phylum | Genus | Anamorphic stage | Hosts | Disease | Example |
|------------------------|----------------|-------------------------|------------------------------|--|------------------------------------|
| <i>Chytridiomycota</i> | Olpidium | | cabbage | root diseases | <i>O. brassicae</i> |
| | Physoderma | | corn | brown spot | <i>P. maydis</i> |
| | Synchytrium | | alfalfa | crown wart | <i>P. (= Urophlyctis) alfalfae</i> |
| | | | potato | potato wart | <i>S. endobioticum</i> |
| <i>Zygomycota</i> | Rhizopus | | fruits and vegetables | bread molds and soft rot | <i>R. oligosporus</i> |
| | Choanephora | | squash | soft rot | <i>C. cucurbitarum</i> |
| | Mucor | | fruits and vegetables | bread mold and storage rots | <i>M. indicus</i> |
| <i>Ascomycota</i> | Taphrina | | peach plum oak | leaf curl leaf blister and so forth | <i>T. deformans</i> |
| | Galactomyces | | citrus | sour rot | <i>G. candidum</i> |
| | Blumeria | | cereals and grasses | powdery mildew | <i>B. graminis</i> |
| | Erysiphe | Oidium | many herbaceous plants | powdery mildew | <i>E. pisi</i> |
| | Leveillula | | tomato | powdery mildew | <i>L. taurica</i> |
| | Microsphaera | | lilac | powdery mildew | <i>M. penicillata</i> |
| | Oidium | | tomato | powdery mildew | <i>O. neolycopersici</i> |
| | Podosphaera | | apple | powdery mildew | <i>P. leucotricha</i> |
| | Sphaerotheca | | roses and peach | powdery mildew | <i>S. pannosa</i> |
| | Uncinula | | grape | powdery mildew | <i>U. necator</i> |
| | Nectria | | trees | twig and stem cankers | <i>N. galligena</i> |
| | Gibberella | | corn and small grains | foot or stalk rot | <i>F. graminearum</i> |
| | | Fusarium | several plants | vascular wilts root rots stem rots seed infections | <i>F. oxysporum</i> |
| | Claviceps | | grain crops | ergot | <i>C. purpurea</i> |
| | Ceratocystis | Chalara | oak | oak wilt | <i>C. fagacearum</i> |
| | | | stone fruit and sweet potato | cankers and root rot | <i>C. fimbriata</i> |
| | | | pineapple | butt rot | <i>C. paradoxa</i> |
| | Monosporascus | | cucurbits | root rot and collapse | <i>M. cannonballus</i> |
| | Glomerella | | apple | anthracnoses and bitter rot | <i>G. cingulata</i> |
| | | Colletotrichum | many plants | anthracnoses | <i>C. lindemuthianum</i> |
| | Phyllachora | | grasses | leaf spots | <i>P. graminis</i> |
| | Ophiostoma | Sporothrix and Graphium | elm | Dutch elm disease | <i>O. novo-ulm</i> |
| | Diaporthe | | | citrus melanose | <i>D. citri</i> |
| | | | | eggplant fruit rot | <i>D. vexans</i> |
| | | | | soybean pod and stem rot | <i>D. phaseolorum</i> |
| | Gaeumannomyces | | grain crops and grasses | take-all disease | <i>G. graminis</i> |
| | Magnaporthe | | rice | rice blast | <i>M. grisea</i> |
| | Cryphonectria | | chestnut | blight disease | <i>C. parasitica</i> |
| | Leucostoma | | peach and other trees | canker diseases | <i>L. peroonii</i> |
| | Hypoxyton | | poplars | canker disease | <i>H. mammatum</i> |
| | Rosellinia | | fruit trees and vines | root diseases | <i>R. necatrix</i> |
| | Xylaria | | trees | tree cankers and wood decay | <i>X. longipes</i> |
| Eutypa | | fruit trees and vines | canker | <i>E. armeniaca</i> | |
| Mycosphaerella | Cercospora | Banana | Sigatoka disease | <i>M. musicola and M. fijiensis</i> | |
| | Septoria | cereals and grasses | leaf spots | <i>M. graminicola</i> | |
| | | strawberry | leaf spot | <i>M. fragariae</i> | |

| | | | | |
|----------------------|-----------------|-------------------------|---|--|
| Elsinoë | | citrus trees | citrus scab | <i>E. fawcetti</i> |
| | | grape | anthracnose | <i>E. ampelina</i> |
| | | raspberry | anthracnose | <i>E. veneta</i> |
| Capnodium | | most plants | sooty molds | <i>C. elaeophilum</i> |
| Cochliobolus | Bipolaris | grain crops and grasses | leaf spots and root rots | <i>C. carbonum</i> and <i>B. maydis</i> |
| | Curvularia | grasses | leaf spots | <i>C. lunata</i> |
| Pyrenophora | Drechslera | cereals and grasses | leaf spots | <i>P. graminea</i> |
| Setosphaera | | cereals and grasses | leaf spots | <i>S. turcica</i> |
| Pleospora | Stemphylium | tomato | black mold rot | <i>P. lycopersici</i> and <i>S. solani</i> |
| Leptosphaeria | | cabbage | black leg and foot rot | <i>L. maculans</i> |
| Venturia | | apple | apple scab | <i>V. inaequalis</i> |
| | | pear | pear scab | <i>V. pyrina</i> |
| | Cladosporium | tomato | leaf mold | <i>C. fulvum</i> |
| | | peach and almond | scab | <i>C. carpophilum</i> |
| Guignardia | Phyllosticta | grapes | black rot | <i>G. bidwellii</i> |
| Apiosporina | | cherries and plums | black knot | <i>A. morbosa</i> |
| Hypoderma | | pinus | needle cast | <i>H. desmazierii</i> |
| Lophodermium | | pinus | needle cast | <i>L. pinastri</i> |
| Rhabdocline | | pinus | Douglas fir needle cast | <i>R. weirii</i> |
| Rhynisma | | maple | tar spot of leaves | <i>R. acerinum</i> |
| Monilinia | | stone fruit | brown rot disease | <i>M. fruticola</i> |
| Sclerotinia | | vegetables | white mold | <i>S. sclerotiorum</i> |
| Stromatinia | | gladiolus | corm rot | <i>S. gladioli</i> |
| Pseudopeziza | | alfalfa | leaf spot | <i>P. trifolii</i> |
| Diplocarpon | | quince and pear | black spot | <i>D. maculatum</i> |
| Talaromyces | Penicillium | fruits | blue mold rot | <i>P. digitatum</i> |
| | Aspergillus | seeds | bread mold and seed decays | <i>A. niger</i> |
| Hypocrea | Verticillium | many plants | vascular wilts | <i>V. dahliae</i> |
| Lewia | Alternaria | many plants | leaf spots and blights | <i>A. alternata</i> |
| Setosphaera | Exserohilum | grasses | leaf spots | <i>E. longirostratum</i> |
| Botryosphaeria | Sphaeropsis | apple | black rot | <i>S. pyripitrescens</i> |
| Botryotinia | Botrytis | many plants | gray mold rots | <i>B. cinerea</i> |
| Monilinia | Monilia | stone fruits | brown rot | <i>M. fruticola</i> |
| Diplocarpon | Entomosporium | pear | leaf and fruit spot | <i>E. mespili</i> |
| Greeneria | Melanconium | grape | bitter rot | <i>M. fuliginum</i> |
| <hr/> | | | | |
| <i>Basidiomycota</i> | Ustilago | corn | smut | <i>U. maydis</i> |
| | | oats | loose smuts | <i>U. avenae</i> |
| | | barley | loose smuts | <i>U. nuda</i> |
| | | wheat | loose smuts | <i>U. tritici</i> |
| | Tilletia | wheat | covered smut or bunt | <i>T. caries</i> |
| | | wheat | Karnal bunt | <i>T. indica</i> |
| | Urocystis | onion | smut | <i>U. cepulae</i> |
| | Sporisorium | sorghum | covered kernel smut | <i>S. sorghi</i> |
| | | sorghum | loose sorghum smut | <i>S. cruentum</i> |
| | Sphacelotheca | sorghum | head smut | <i>S. reiliana</i> |
| | Cronartium | pinus | blister rust | <i>C. ribicola</i> |
| | Gymnosporangium | apple | cedar-apple rust | <i>G. juniperi-virginianae</i> |
| | Hemileia | coffee | rust | <i>H. vastatrix</i> |
| | Melampsora | flax | rust | <i>M. lini</i> |
| | Phakopsora | soybeans | rust | <i>P. pachyrrhizi</i> |
| | Puccinia | cereals | rust | <i>P. recondita</i> |
| | Uromyces | beans | rust | <i>U. appendiculatus</i> |
| | Exobasidium | ornamentals | leaf flower and stem galls | <i>E. japonicum</i> |
| | Athelia | many plants | Southern blight | <i>A. rolfsii</i> |
| | Sclerotium | onions | white rot | <i>S. cepivorum</i> |
| | Rhizoctonia | many plants | root and stem rots damping-off and fruit rots | <i>T. cucumeris</i> and <i>R. solani</i> |
| | Thanatephorus | | | |
| | Typhula | turf grasses | snow mold | <i>T. incarnata</i> |
| | Armillaria | trees | root rots | <i>A. mellea</i> |

| | | | |
|----------------|--------------|--|----------------------------------|
| Crinipellis | cacao | witches'-broom | <i>C. perniciosus</i> |
| Marasmius | turf grasses | fairy ring disease | <i>M. oreades</i> |
| Pleurotus | trees | white rot on logs tree stumps and living trees | <i>P. ostreatus</i> ¹ |
| Pholiota | trees | brown wood rot | <i>P. squarrosa</i> |
| Chondrostereum | trees | silver leaf disease | <i>C. purpureum</i> |
| Corticium | turf grasses | red thread disease | <i>C. fuciforme</i> |
| Heterobasidion | trees | root and butt rot | <i>H. annosum</i> |
| Ganoderma | trees | root and basal stem rots | <i>G. boninense</i> |
| Inonotus | trees | heart rot | <i>I. hispidus</i> |
| Polyporus | trees | heart rot | <i>P. glomeratus</i> |
| Postia | trees | wood and root rot | <i>P. fragilis</i> |

Références



- Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T. and Teixeira, P., 2008. Characterization of microbial population of 'Alheira' (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. *J Appl Microbiol* 105: 2187–2194.
- Aldanondo-Ochoa, A.M. and C. Almansa-Sáez, 2009. The private provision of public environment: Consumer preferences for organic production systems. *Land Use Policy* 26: 669–682.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59: 143–69.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., and Guyot, J. P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrated the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5464–5473.
- An, C., Takahashi, H., Kimura, B. and Kuda, T., 2010. Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, ajinarezushi and iwashi-nukazuke. *J Sci Food Agric* 90: 1796–1801.
- Avrahami, S., Liesack, W. and Conrad, R., 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology* 5: 691–705.
- Badgley, C., Moghtader, J., Quintero, E., Zakem, E., Chappell, M.J., Avilès-Vazquez, K., Samulon, A. and Perfecto, I., 2007. Organic agriculture and the global food supply. *Renew. Agric. Food Syst.* 22: 86–108.
- Baranski, M., Srednicka-Tober, D., Volakakis, N., Seal, C., Sanderson, R., Stewart, G.B., Benbrook, C., Biavati, B., Markellou, E., Giotis C., Gromadzka-Ostrowska, J., Rembiałkowska, E., Skwarło-Sońta, K., Tahvonen, R., Janovská, D., Niggli, U., Nicot, P. and Leifert, C., 2014. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. *British Journal of Nutrition* 112: 794–811.
- Bateman, A.S., Kelly, S.D. and Woolfe M., 2007. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2664–2670.

- Bano, N. and Hollibaugh, J.T., 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 505–518.
- Bengtsson, J., Ahnström, J. and Weibull, A.C., 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* 42: 261–269.
- Berbee, M.L., 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 165–187.
- Besson, Y., 2007. Histoire de l'agriculture biologique : une introduction aux fondateurs, Sir Albert Howard, Rudolf Steiner, le couple Müller et Hans Peter Rusch, Masanobu Fukuoka. Thèse de Doctorat. Université de Technologie de Troyes, France, 775 p.
- Beuchat, L.R., 2006. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal* 108: 8–53.
- Bigot, C., Meile, J.C., Kapitan, A. and Montet, D., 2015. Discriminating organic and conventional foods by analysis of their microbial ecology: An application on fruits. *Food Control* 48: 123–129.
- Brambilla, G. and Testa, C., 2014. Food safety/food security aspects related to the environmental release of pharmaceuticals. 115: 81–87.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M. and Mills, D.A., 2013. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 139–148.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W. and Mills, D.A., 2012. A review of molecular methods for microbial community profiling of beer and wine. *Journal of the American Society for Brewing Chemists* 70: 150–162.
- Bonneuil, C., Demeulenaere, E., Thomas, F., Joly, P.B., Allaire, G. and Goldringer, I., 2006. Innover autrement ? La recherche agronomique face à l'avènement d'un nouveau régime de production et régulation des savoirs en génétique végétale. *Courrier de l'Environnement de l'INRA*, n°30, 29–52.
- Burton, J.P., Cadieux, P.A. and Reid, G., 2003. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 97–101.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol* 25: 169–193.

- Butault, J.P., Delame, N., Jacquet, F., Rio, P., Zardet, G., Dedryver, C.A., Volay, T., Gary, C., Guichard, L., Pitrat, M. and Sauphanor B., 2010. L'utilisation des pesticides en France : État des lieux et perspectives de réduction. Colloque de la SFER : Lyon 11-12 mars 2010.
- Camin, F., Perini, M., Bontempo, L., Fabroni, S., Faedi, W., Magnani, S., Baruzzi, G., Bonoli, M., Tabilio, M.R., Musmeci, S., Rossmann, A., Kelly, S.D. and Rapisard, P., 2011. Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. *Food Chemistry* 125: 1072–1082.
- Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., Van der Veer, G. and Van Ruth, S.M., 2013. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *J Sci Food Agric.* 1: 12–28.
- Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C. and Muyzer, G., 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66: 499–508.
- Chandel, N.S., Tuveson D.A., 2014. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *N Engl J Med* 371: 177–178.
- Champomier Vergès, M.-C. and Zagorec, M., 2015. La métagénomique : Développements et futures applications. éd QUAE, collection Savoir faire.
- Chen, K. and Patcher, L., 2005. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Comput. Biol.* 1: e24.
- Chomarat, M. and Breysse F., 2011. Applications of High Resolution Melting analysis in infectious diseases. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 26: 207–211.
- Chung, I.M., Park, I., Yoon, J.Y., Yang, Y.S. and Kim, S.H., 2014. Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 160: 214–218.
- Cocolin, L., Bisson, L.F. and Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 189: 81–87.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5113–5121.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R. and Rantsiou, K., 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 167: 29–43.

- Crump, B.C., Kling, G.W., Bahar, M. and Hobbie, J.E., 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2253–2268.
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., Maquet, A., 2014. Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International* pp. 95–107
- Codex Alimentarius* (1999): ‘Commission du *Codex Alimentarius* en 1999’. [format pdf] CAC/GL 32 – 1999 et l’extrait de Règles de base IFOAM, 2000 : http://www.ifoam.org/partners/advocacy/pdfs/Codex_Guidelines.pdf
- Dalmacio, L.M., Angeles, A.K., Larcia, L.L., Balolong, M.P. and Estacio, R.C., 2011. Assessment of bacterial diversity in selected Philippine fermented food products through PCR-DGGE. *Benef Microbes* 2: 273–281.
- Delgado, S., Rachid, C.T., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, A., Peixoto, R.S. and Mayo, B., 2013. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiol.* 36: 103–111.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., Von Mering, C. and Vorholt, J.A., 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16428–16433.
- De Oliveira, D.N., Dos Santos, G.A., Rodrigues, L.R., Ferreira, M.S., Sabrina de Bona Sartor and Catharino, R.R., 2013. The potential of metabolic fingerprinting for quality control and authentication of food. *Hot Topics in Metabolomics: Food and Nutrition*, éd Future Science Ltd pp. 30–39.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T.L. and Massana, R., 2001a. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. *Appl Environ Microbiol* 67: 2942–2951.
- Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297–302.
- Dobermann, A., 2012. Getting back to the field. *Nature* 485: 176–177.
- Dolci, P., Zenato, S., Pramotton, R., Barmaz, A., Alessandria, V., Rantsiou, K. and Cocolin, L., 2013. Cheese surface microbiota complexity: RT-PCR-DGGE, a tool for a detailed picture? *Int J Food Microbiol.* 162: 8–12.

- Donskey, C.J., Hujer, A.M., Das, S.M., Pultz, N.J., Bonomo, R.A. and Rice, L.B., 2003. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J. Microbiol. Methods*. 54: 249–256.
- Duarte, S., Cássio, F. & Pascoal, C. (2012) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology: insights from freshwaters. A. Lazinica (Ed.), *Gel Electrophoresis/Book 1*, 979-953-307-474-9, pp. 173–196.
- Dufossé, L., Donadio, C., Valla, A., Meile, J. C., and Montet, D., 2013. Determination of speciality food salt origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application on marine salts produced in solar salterns from the French Atlantic Ocean. *Food Control* 32: 644–649.
- Dupuy, C., 2004. Analyse et Conception d’outils pour la traçabilité de produits agroalimentaires afin d’optimiser la dispersion des lots. Thèse de Doctorat Ingénieur Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 24 Septembre 2004, pp 126.
- Durand, N., 2012. Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes. Thèse de Doctorat. Université Montpellier 2, France, 240 p.
- Durand, N., El Sheikha, A.F., Suarez-Quiros, M.L., Gonzales-Rios, O., D Nganou, N., Fontana-Tachon, A. and Montet, D., 2012. Dynamics and Biodiversity of Fungi and Yeasts by PCR-DGGE, with the Objective of Understanding Ochratoxin Production on Coffee Beans. *Food control* 34: 466–471.
- Durel, C.E., Laurens, F., Caffier, V., Le Cam, B. and Sapoukhina, N., 2007. Les apports de l’innovation variétale : Recherches menées pour améliorer la résistance du pommier à la tavelure. *Innovations Agronomiques* 1: 47–61.
- El Sheikha, A.F., Condur, A., Métayer, I., Nguyen, D.D., Loiseau, G. and Montet, D., 2009. Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. *Yeast* 26: 567–573.
- El Sheikha, A., 2010. Détermination de l’origine géographique des fruits du Karité et du Physalis par l’utilisation d’empreintes génétiques sur la communauté microbienne par PCR/DGGE. Analyse des propriétés biologiques d’extraits de fruits. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, 229 p.
- El Sheikha, A.F. and Montet, D., 2011. Determination of fruit origin by using 28S rDNA finger-printing of fungi communities by PCR-DGGE: An application to Physalis fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits* 66: 79–89.

- Embong, Z., Wan Hitam, W.H., Yean, C.Y., Rashid, N.H., Kamarudin, B., Abidin, S.K., Osman, S., Zainuddin, Z.F. and Ravichandran, M., 2008. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology* 8:7.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*. 56: 297–314.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. and Villani, F., 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl Environ Microbiol*. 72: 4663–4671.
- Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S (1999) Introduction to multi- and megavariate data analysis using projection methods (PCA and PLS). Umetrics, Umea.
- Fischler, C., 1993. *L'Homnivore*. Ed. Odile Jacob pp. 202–203.
- Flores, P., Lopez, A., Fenoll, J., Hellin, P. and Kelly, S., 2013. Classification of organic and conventional sweet peppers and lettuce using a combination of isotopic and bio-markers with multivariate analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 31: 217–225.
- Forney, L.J., Zhou, X. and Brown, C.J., 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology* 7: 210–220.
- FranceAgriMer, Ctifl, Interfel "Achats de fruits et légumes frais par les ménages français", 2014.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. and Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* 4: 634–643.
- Fuka, M.M., Wallisch, S., Engel, M., Welzl, G., Havranek, J. and Schloter, M., 2013. Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLoS One* 20: e80734.
- Fuller, R.J., Norton, L.R., Feber, R.E., Johnson, P.J., Chamberlain, D.E., Joys, A.C., Mathews, F., Stuart, R.C., Townsend, M.C., Manley, W.J., Wolfe, M.S., Macdonald, D.W., and Firbank, L.G. Benefits of organic farming to biodiversity vary among taxa. *Biol Lett*. 22: 431–434.
- Gabriel, D., Sait, S.M., Kunin, W.E. and Benton, T.G., 2013. Food production vs. biodiversity: comparing organic and conventional agriculture. *Journal of Applied Ecology* 50: 355–364.

- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S. and Labra, M., 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50: 55–63.
- Galimberti, A., Brunoa, A., Mezzasalma, V., De Mattiab, F., Brunia, I. and Labra, M., 2015. Emerging DNA-based technologies to characterize food ecosystems. *Food Research International* 69: 424–433.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113–118.
- Gill, P., Brenner, C.H., Buckleton, J.S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W.R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P.M. and Weir, B.S., 2006. DNA commission of the international society of forensic genetics: recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci. Int.* 160: 90–101.
- González-Fernández, R., Prats, E. and Jorrín-Novo, J.V., 2010. Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *J Biomed Biotechnol* 2010: 932527.
- Gonzalez, R., Quirós, M. and Morales, P., 2013. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci. Technol* 29: 55–61.
- Gracia, A. and de Magistris, T., 2008. The demand for organic foods in the South of Italy: A discrete choice model. *Food Policy* 33: 386–396.
- Gray, N.D., Miskin, I.P., Kornilova, O., Curtis, T.P. and Head, I.M., 2002. Occurrence and activity of Archea in areated activated sludge wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol.* 4: 158–168.
- Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W., 2013. Redisposition of phoma-like anamorphs in *Pleosporales*. *Stud Mycol* 75: 1–36.
- Guan, X. and Sun, L.N., 2014. Current situation and the harm of soil heavy metal pollution and food safety. 2nd International Conference on Renewable Energy and Environmental Technology, REET 2014, Trans Tech Publications Ltd pp. 612–614.
- Guéguen, L. and Pascal, G., 2010. An update on the nutritional and health value of organic foods. *Cah Nut Diet* 45:130–143.
- Gurtler, V., Garrie, H.D. and Mayall, B.C., 2002. Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *Electrophoresis* 23: 3310–3320.

- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H. and Straif, K., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 16: 490–491.
- Haegeman, B., Godon, J.J., Sen, B. and Hamelin, J., 2008. Measurement of microbial diversity using fingerprints. *Environmental Microbiology*.
- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K.B., Montet, D. and Meile, J.C., 2015. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: towards the identification of molecular markers. *Food Control* 48: 117–122.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and P. D. Ryan, 2001. PAST: Pale ontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: pp9.
- Hemelrijck, W.V., Croes, E. and Creemer, P., 2012. Potassium bicarbonate: a conceivable alternative control measure towards scab on pome fruits. 15th International Conference on Organic Fruit Growing —Ecofruit, 20-22 February, 2012 at Hohenheim/Germany.
- Herrero, B., Madrinan, M., Vietes, J.M. and Espineira, M., 2010. Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real time PCR. *J Agric Food Chem* 58: 4794–4799.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. and De Vos, P. 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods* 26: 247–259.
- Hoefkens, C., Vandekinderen, I., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., Baert, K., Sioen, I., De Henauw, S., Verbeke, W. and Van Camp, J., 2009. A literature-based comparison of nutrient and contaminant contents between organic and conventional vegetables and potatoes. *British Food Journal* 111: 1078–1097.
- Hole, D.G., Perkins, A.J., Wilson, J.D., Alexander, I.H., Grice, P.V. and Evans, A.D., 2005. Does organic farming benefit biodiversity? *Biological Conservation*. 122:113–130.
- Hollander M., Wolfe D.A., 1999, *Nonparametric Statistical Methods*, 2^{ème} éd. New York, John Wiley and Sons, 816p.
- Hoogenboom, L.A.P., Bokhorst, J.G., Northolt, M.D., Van de Vijver, L. P. L., Broex, N. J. G., Mevius, D. J., Meijs, J. A. C. and Van der Roes, J., 2008. Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products. *Food Additives & Contaminants* 25: 1197–1209.
- Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, C. and Han, Y., 2009. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control* 20: 99–104.

- Huber, M., Rembiałkowska, E., Średnicka, D., Bügel, S. and van de Vijver, L.P.L., 2011. Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences*, 48: 103–109.
- Ibekwe, A.M., Kennedy, A.C., Frohne, P.S., Papiernik, S.K., Yang, C.H. and Crowley, D.E., 2002. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiology Ecology* 39: 183–191.
- Ignarro, L.J., Balestrieri, M.L. and Napoli, C., 2007. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res.* 73: 326–340.
- Ilie, L., Fazayeli, F. and Ilie, S., 2011. HiTEC: accurate error correction in high throughput sequencing data. *Bioinformatics* 27: 295–302.
- Jannoyer, M. and Chillet, M., 1998. Improving banana growing conditions with the Katryx R bag. *Fruits*, 53: 219–228.
- Jaquier, 2014. Approche génomique des interactions entre l'implantation du microbiote digestif chez le lapereau et la maturation du système immunitaire. Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Thèse de doctorat à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 11 Décembre 2014.
- Justé, A., Lievens, B., Klingeberg, M., Michiels, C.W., Marsh, T.L. and Willems, K.A., 2008. Predominance of *Tetragenococcus halophilus* as the cause of sugar thick juice degradation. *Food Microbiol.* 25: 413–421.
- Kagkli, D.M., Folloni, S., Barbau-Piednoir, E., Van den Eede, G. and Van den Bulcke, M., 2012. Towards a pathogenic *Escherichia coli* detection platform using multiplex SYBR®Green Real-time PCR methods and high resolution melting analysis. *PLoS One* 7: e39287.
- Karabelas, A.J., Plakas, K.V., Solomou, E.S., Drossou, V. and Sarigiannis, D.A., 2009. Impact of European legislation on marketed pesticides--a view from the standpoint of health impact assessment studies. *Environ Int.* 35: 1096–107.
- Kerkoud, M., Manceau, C. and Paulin, J.P., 2002. Rapid Diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the Causal Agent of Blister Spot of Apple, by Polymerase Chain Reaction Using Specifically Designed *hrpL* Gene Primers. *Phytopathology* 92: 1077–1083.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. and Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58: 169–188.
- Kishi, M., 2005. The health impacts of pesticides: What do we know now? Chapter 2. In Pretty (ed) *The pesticide detox: Towards a more sustainable agriculture*.

- Klaus, V.H., Holzel, N., Prati, D., Schmitt, B., Schoning, I., Schruppf, M., Fischer, M. and Kleinebecker, T., 2013. Organic vs. Conventional Grassland Management: Do ^{15}N and ^{13}C Isotopic Signatures of Hay and Soil Samples Differ? PLoS ONE 8: e78134.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Von Mering, C. and Vorholt, J.A., 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. ISME J 6: 1378–1390.
- Knief, C., 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. Front Plant Sci 5: 216.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. and Woldendorp, J. W., 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Applied and Environmental Microbiology 63: 1489–1497.
- Kurtzman, C.P., and Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73: 331–371.
- Laursen, K.H., Schjoerring, J.K., Kelly, S.D. and Husted, S., 2014. Authentication of organically grown plants – advantages and limitations of atomic spectroscopy for multi-element and stable isotope analysis. Trends in Analytical Chemistry 59: 73–82.
- Le Nguyen, D.D., Hanh, H.N., Dijoux, D., Loiseau, G. and Montet, D., 2008. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application on Pangasius fish from Viet Nam. Food Control 19: 454–460.
- Le Nguyen, D.D., 2008. Détermination de l'origine géographique des poissons par l'obtention de l'empreinte génétique de leur communauté bactérienne par PCR-DGGE. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 233 p.
- Leesing, R., 2005. Identification and validation of specific markers for traceability of aquaculture fish for import/export. Ph.D. dissertation, University of Montpellier 2, France.
- Leeuwen, K.A., Prenzler, P.D., Ryan, D. and Camin F., 2014. Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages. Institute of Food Technologists 13: 814–837.
- Leff, J.W. and Fierer, N., 2013. Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. PLoS One 8: e59310.

- Leveau, J.H. and Preston, G.M., 2008. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytol* 177: 859–876.
- Li, R., Khafipour, E., Krause, D.O., Entz, M.H., de Kievit, T.R. and Fernando, W.G., 2012. Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities. *PLoS One* 7: e51897.
- Lif Holgerson, P., Harnevik, L., Hernell, O. and Tanner, A.C., 2011. Johansson I. Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *J Dent Res* 90: 1183–1188.
- Lindow, S.E. and Leveau, J.H., 2002. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 238–243.
- Lindow, S. and Brandl, M., 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875–1883.
- Lipthay, J.R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J. and Sørensen, S.J., 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1607–1614.
- Liu, Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L. and Knight, R., 2008. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res* 36: e120.
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S.E., Daum, R.S., Fridkin, S.K., Gorwitz, R.J., Kaplan, S.L., Karchmer, A.W., Levine, D.P., Murray, B.E., Rybak, M., Talan, D.A. and Chambers, H.F., 2011. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 52: 18–55.
- Luna, G.M., Dell'Anno, A. and Danovaro, R., 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology* 8: 308–320.
- Madesis, P., Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A. and Tsaftaris, A., 2014. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* 60: 163–172.
- Maffei, D.F., Arruda Silveira, N.F., Penha Longo, M. and Catanozi, M., 2013. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control* 29: 226–230.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., De Vargas, C. and Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2: e593.

- Mäkinen, N., Mehine, M., Tolvanen, J., Kaasinen, E., Li Y., Lehtonen, H.J., Gentile, M., Yan, J., Enge, M., Taipale, M., Aavikko, M., Katainen, R., Virolainen, E, Böhling, T., Koski, T.A., Launonen, V., Sjöberg, J., Taipale, J., Vahteristo, P. and Aaltonen, L.A., 2011. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science* 334: 252–255.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560–564.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2354–2359.
- Mc Bain, A.J., Bartolo, R.G., Catrenich, C.E., Charbonneau, D., Ledder, R.G. and Gilbert, P., 2003. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *J. Appl. Microbiol.* 94: 655–664.
- Medjedović, A., Frank, J., Schroers, H.J., Oertel, B. and Batzer, J.C., 2014. *Peltaster cerophilus* is a new species of the apple sooty blotch complex from Europe. *Mycologia* 106: 525–536.
- Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J. and Hammes, W.P., 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 475–482.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11: 31–46.
- Michels, S., 2014. *Le marketing de la peur*. Ed. Eroles.
- Mie, A., Laursen, K.H., Åberg, K.M., Forshed, J., Lindahl, A., Thorup-Kristensen, K., Olsson, M., Knuthsen, P., Larsen, E.H. and Husted S., 2014. Discrimination of conventional and organic white cabbage from a long-term field trial study using untargeted LC-MS-based metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 406: 2885–2897.
- Mihailova, A., Pedentchouk, N. and Kelly, S.D., 2014. Stable isotope analysis of plant-derived nitrate – Novel method for discrimination between organically and conventionally grown vegetables. *Food Chemistry* 154: 238–245.
- Mondelaers, K., Aertsens, J. and Van Huylenbroeck, G., 2009. A meta-analysis of the differences in environmental impacts between organic and conventional farming. *British Food Journal* 111: 1098–1119.

- Moroni, A.V., Arendt, E.K. and Dal Bello, F., 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiology* 28: 497–502.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1: 263–273.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59: 695–700.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V. and Ovreas, L., 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64: 1382–1388.
- Nawrocki, A., Thorup-Kristensen, K. and Jensen, O.N., 2011. *J Proteomics*. Quantitative proteomics by 2DE and MALDI MS/MS uncover the effects of organic and conventional cropping methods on vegetable products. *J Proteomics* 74: 2810–2825.
- Nemecek, T., Dubois, D., Huguenin-Elie, O. and Gaillard, G., 2011a. Life cycle assessment of Swiss farming systems: I. Integrated and organic farming. *Agric Syst* 104: 217–232.
- Nielsen, E.N., Emgberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H. and On, S.L., 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3800–3810.
- Nicol, G.W., Glover, L.A. and Prosser, J.I., 2003. The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* 5: 152–162.
- Nikolcheva, L.G., Cockshutt, A.M. and Bärlocher, F., 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decomposing leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2548–2554.
- Nocker, A., Burr, M. and Camper, A.K., 2007. *Microb Ecol.* Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. 54: 276–289.
- Norris, T.B., Wraith, J.M., Castenholz, R.W. and McDermott, T.R., 2002. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl Environ Microbiol* 68: 6300–6309.

- Novotná, H., Kmiecik, O., Gałązka, M., Krtková, V., Hurajová, A., Schulzová, V., Hallmann, E., Rembialkowska, E. and Hajšlová, J., 2012. Metabolomic fingerprinting employing DART-TOFMS for authentication of tomatoes and peppers from organic and conventional farming. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29: 1335–1346.
- Ohm, R.A., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C.L., Horwitz, B.A., Barry, K.W., Condon, B.J., Copeland, A.C., Dhillon, B., Glaser, F., Hesse, C.N., Kosti, I., LaButti K., Lindquist, E.A., Lucas, S., Salamov, A.A., Bradshaw, R.E., Ciuffetti, L., Hamelin, R.C., Kema, G.H., Lawrence, C., Scott, J.A., Spatafora, J.W., Turgeon, B.G., de Wit, .PJ., Zhong, S., Goodwin, S.B. and Grigoriev I.V. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS Pathog* 8: e1003037.
- Ordax, M., Piquer-Salcedo, J.E., Santander, R.D., Sabater-Muñoz, B., Biosca, E.G., López, M.M. and Marco-Noales, E., 2015. Medfly *Ceratitis capitata* as Potential Vector for Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*: Survival and Transmission. *PLoS One* 5: e0127560.
- Ottesen, A.R., White, J.R., Skaltsas, D.N., Newell, M.J., and Walsh, C.S., 2009. Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop. *J Food Prot.* 72: 2321–2325.
- Pacifico, D., Casciani, L., Ritota, M., Mandolino, G., Onofri, C., Moschella, A., Parisi, B., Cafiero, C. and Valentini, M., 2013. NMR-based metabolomics for organic farming traceability of early potatoes. *J Agric Food Chem* 61: 11201–11211.
- Palmieri, L., Bozza, E. and Giongo, L., 2009. Soft fruit traceability in food matrices using real-time PCR. *Nutrients* 1: 316–328.
- Pedros-Alio, C., 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* 14: 257–263.
- Peres, B., Barlet, N., Loiseau, G. and Didier Montet, 2007. Review of the current methods of analytical traceability allowing determination of the origin of foodstuffs 18: 228–235.
- Pérez-Marín, D., Sánchez, M.T., Paz, P., González-Dugo, V. and Soriano, M.A., 2011. Postharvest shelf-life discrimination of nectarines produced under different irrigation strategies using NIR-spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology* 44: 1405–1414.
- Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F. and Ferranti, P., 2012. Novel Mass Spectrometry-Based Applications of the 'Omic' Sciences in Food Technology and Biotechnology. *Food Technology and Biotechnology* 50: 286–305.

- Pinu, F.R., 2015. Metabolomics—The new frontier in food safety and quality research. *Food Research International*. 72: 80–81.
- Porcellato, D., Grønnevik, H., Rudi, K., Narvhus, J. and Skeie, S.B., 2012. Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. *Lett Appl Microbiol*. 54: 344–351.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. and Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35: 7188–7196.
- Pulido, R.P., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Cañamero, M.M. and Gálvez, A., 2005. Microbiological Study of Lactic Acid Fermentation of Caper Berries by Molecular and Culture-Dependent Methods. 71: 7872–7879.
- Quintas, G., Portillo, N., Garcia-Canaveras, J.C., Castell, J.V., Ferrer, A. and Lahoz, A., 2012. Chemometric approaches to improve PLSDA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool *Metabolomics* 8: 86–98.
- Rahmann, R., 2011. Biodiversity and organic farming: What do we know? *Agriculture and forestry research* 61: 189–208.
- Rainey, P.B. and Bailey, M.J., 1996. Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. *Mol Microbiol*. 19: 521–533.
- Randazzo, C.L., Ribbera, A., Pitino, I., Romeo, F.V., Caggia C., 2012. Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol*. 32: 87–96.
- Raspor, P., 2005. Bio-markers: Traceability in food safety issues. *Acta Biochimica Polonica* pp. 659–664.
- Reed, G.H., Kent, J.O. and Wittwer, C.T., 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8: 597–608.
- Reeson, A.F., Jancovic, T., Kasper, M.L., Rogers, S. and Austin, A.D., 2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Mol. Biol.* 12: 85–91.
- Reganold, J.P., Andrews, P.K., Reeve, J.R., Carpenter-Boggs, L., Schadt, C.W., Alldredge, J.R., Ross, C.F., Davies, N.M. and Zhou, J., 2010. Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry agroecosystems. *PLoS One* 485: 176–177.

- Reilly, K., Cullen, E., Lola-Luz, T., Stone, D., Valverde, J., Gaffney, M., Brunton, N., Grant, J. and Griffiths, B.S., 2013. Effect of organic, conventional and mixed cultivation practices on soil microbial community structure and nematode abundance in a cultivated onion crop. *J Sci Food Agric.* 93: 3700–3709.
- Rundlöf, M., Bengtsson, J. and Smith, H.G., 2008. Local and landscape effects of organic farming on butterfly species richness and abundance. *Journal of Applied Ecology* 45: 813–820.
- Sánchez, M.T., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E. and Pérez-Marín, D., 2013. NIRS technology for fast authentication of green asparagus grown under organic and conventional production systems. *Postharvest Biology and Technology* 85: 116–123.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467.
- Scarano, D. and Rao, R., 2014. DNA markers for food products authentication. *Diversity* 6: 579–596.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. and Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B. and Uchiyama, H., 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5142–5150.
- Seltenrich, N., 2015. New link in the food chain? Marine plastic pollution and seafood safety. *Environmental Health Perspectives* 123: A34–A41.
- Sengenès, J., 2012. Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN. *Molecular Biology*. Thèse de doctorat Université Pierre et Marie Curie de Paris, 21 Octobre 2012.
- Schäfer, H. and G. Muyzer, 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. In: Paul J.H. (ed.), *Methods in Microbiology*, 30: 425–468, Academic Press, London.
- Schippa, S., Iebba, V., Barbato, M., Di Nardo, G., Totino, V., Checchi, M.P., Longhi, C., Maiella, G., Cucchiara, S. and Conte, M.P., 2010. A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC Microbiol* 10: 175.

- Schoch, C.L., 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1041–1052.
- Shannon, D., Sen, A.M. and Johnson, D.B., 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soil Use and Management* 18: 274–283.
- Simenc, J. and Potocnik, U., 2011. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 47: 283–290.
- Smith, C.J. and Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 67: 6–20.
- Smith-Spangler, C., Brandeau, M.L., Hunter, G.E., Bavinger, J.C., Pearson, M., Eschbach, P.J., Sundaram, V., Liu, H., Schirmer, P., Stave, C., Olkin, I. and Bravata, D.M., 2012. Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives? A systematic review. *Ann Intern Med* 157: 348–366.
- Spiewak, R., 2001. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann Agric Environ Med* 8: 1–5.
- Stach, J.E.M, Bathe, S., Clapp, J.P. and Burns, R.G., 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 139–151.
- Stamper, D.M., Walch, M. and Jacobs, R.N., 2003. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 852–860.
- Starliper, C.E., 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* 2: 97–108.
- Stone, J.J., Dollarhide, C.R., Benning, J.L., Gregg Carlson, C. and Clay, D.E., 2012. The life cycle impacts of feed for modern grow-finish Northern Great Plains US swine production. *Agricultural Systems* 106: 1–10.
- Storck, R., 1966. Nucleotide Composition of Nucleic Acids of Fungi II. Deoxyribonucleic Acids. *J Bacteriol* 91: 227–230.
- Tajiri-Utagawa, E., Hara, M., Takahashi, K., Watanabe, M. and Wakita, T., 2009. Development of a rapid high-throughput method for high-resolution melting analysis for routine detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 47: 435–440.

- Tang, J., Zeng, Z., Wang, H., Yang, T., Zhang, P., Li, Y., Zhang, A., Fan, W., Zhang, Y., Yang, X., Zhao, S., Tian, G. and Zou, L., 2008. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods* 75: 432–436.
- Tatsadjieu, N. L., Maiwore, J., Hadjia, M.B., Loiseau, G., Montet, D. and Mbofung, C.M.F., 2010. Study of the microbial diversity of *Oreochromis niloticus* of three lakes of Cameroon by PCR-DGGE: Application to the determination of the geographical origin. *Food Control* 21: 673–678.
- Tenenhaus, M., 1998. La régression PLS. Editions Technip, Paris.
- Tenenhaus, M., Esposito Vinzi, V., Chatelin, Y., and Lauro, C., 2005. PLS path modeling. *Computational Statistics and Data Analysis*, 48: 159–205.
- Theelen, B., Silvestri, M., Gueho, E., van Belkum, A. and Boekhout, T., 2001. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphisms (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.* 1: 79–86.
- Tres, A., van der Veer, G., Perez-Marin, M. D., van Ruth, S. M., and A. Garrido-Var, 2013. Authentication of Organic Feed by Near-Infrared Spectroscopy Combined with Chemometrics: A Feasibility Study. *J. Agric. Food Chem* 60: 8129–8133.
- Tuck, S. L., Winqvist, C., Mota, F., Ahnström, J., Turnbull, L. A. and Bengtsson, J., 2014. Land-use intensity and the effects of organic farming on biodiversity: a hierarchical meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* 51: 746–755.
- Tuomisto, H.L., Hodge, I.D., Riordan, P. and Macdonald, D.W., 2012. Does organic farming reduce environmental impacts? - A meta-analysis of European research. *J Environ Manage* 112: 309–320.
- Van Hannen, E. J., Zwart, G., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J. and Laanbroek, H. J., 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 795–801.
- Van Hijum, S.A., Vaughan, E.E. and Vogel, R.F., 2013. Application of state-of-art sequencing technologies to indigenous food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 178–186.
- Van Ruth, S., Alewijn, M., Rogers, K., Newton-Smith, E., Tena, N., Bollen, M. and Koot, A., 2011. Authentication of organic eggs by carotenoid profiling. *Food Chemistry*, 126, 1299–1305.

- Voříšková, J. and Baldrian, P. 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME Journal* 7: 477–486.
- Wallis, P.D., Haynes, R.J., Hunter, C.H. and Morris C.D. 2010. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology* 46: 147–150.
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D. and Bending, G.D., 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1744–1755.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y: Academic Press, Inc.; 1990. pp. 315–322.
- Wiechec, E., Wiuf, C., Overgaard, J. and Hansen, L.L., 2011. High-resolution melting analysis for mutation screening of RGS11, RGS16, and RGS8 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 397–407.
- Winqvist, C., Ahnstrom, J. and Bengtsson, J., 2012. Effects of organic farming on biodiversity and ecosystem services: taking landscape complexity into account. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1249: 191–203.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51: 221–271.
- Wold, 1987. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2: 37–52.
- Woolfe, M. and Primrose, S., 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22: 222–226.
- Yashiro, E., Spear, R.N. and McManus, P.S., 2011. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *J Appl Microbiol* 110: 1284–1296.
- Zhao, Y., Zhang, B., Chen, G., Chen, A., Yang, S. and Ye, Z., 2014. Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. *Food Chemistry* 145: 300–305.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D. and De Vos, W.M., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3854–3859.

Résumé

Avec la mondialisation et l'industrialisation de l'alimentation, la fraude et les cas de contamination des aliments peuvent avoir un impact international et entraîner des conséquences de grande envergure à la fois sur l'économie et la santé des consommateurs (Cubero-Leon *et al.*, 2014). La fraude et l'authentification sont donc devenues des sujets émergents dans le secteur alimentaire. D'autant que les fraudes sont de plus en plus sophistiquées pour contourner au mieux les contrôles et donc de plus en plus difficiles à détecter par des analyses classiques. Les aliments issus de l'agriculture biologique (AB ou bio) font d'ailleurs partie des aliments qui risquent le plus de faire l'objet de fraude. Mais la traçabilité des aliments est principalement garantie par des moyens administratifs (règlement UE 178/2002). C'est pourquoi il est nécessaire de recourir à des techniques analytiques avancées pour détecter les produits non-conformes et pour garantir la traçabilité et l'authenticité des aliments, notamment ceux issus de l'AB. Notre étude est basée sur l'hypothèse que les traitements, associés à différents types d'agriculture, ont un impact mesurable sur la microflore des aliments. L'objectif principal était de pouvoir utiliser l'environnement microbien des aliments pour les discriminer en fonction de leur mode de production. La PCR-DGGE, un outil moléculaire d'écologie microbienne, pourrait servir à discriminer les modes de production d'aliments par analyse des profils génétiques des ADN_r bactériens et fongiques. L'analyse des profils génétiques microbiens de nectarines, pêches, bananes et de pommes a montré qu'il était possible de différencier les fruits en fonction de leur mode de production. La robustesse de notre méthodologie a été démontrée en comparant les résultats obtenus sur deux années de récolte successives. L'étude des variations intra-parcellaires ont également permis de démontrer que les fruits bio pouvaient être différenciés des conventionnels indépendamment de leur position dans la parcelle (centre vs bord) ou encore sur l'arbre. Les différences observées au niveau de la structure des communautés microbiennes étaient donc suffisamment importantes pour conclure que les traitements appliqués ont un impact significatif sur ces communautés. De plus, l'identification des espèces microbiennes obtenues après PCR-DGGE et NGS a révélé que certains groupes microbiens (fongiques et bactériens) pourraient être spécifiques aux aliments bio. Cependant, l'effet terroir est un critère important à prendre en compte dans la mise en place d'un outil d'authentification des aliments bio. Une application sur le terrain serait donc difficile à prévoir si elle est parcelle-spécifique. Cette étude s'inscrit à la base de la mise au point d'un outil analytique qui pourrait permettre de répondre aux besoins des professionnels de l'industrie alimentaire en termes d'authenticité et de sûreté alimentaire, en particulier pour aider les organismes certificateurs à contrôler et authentifier les aliments bio. Cette étude a également permis d'enrichir les connaissances actuelles sur l'écosystème microbien des fruits en fonction des pratiques agricoles.

Mots clefs : pratiques agricoles, authenticité, traçabilité, fraude, flore microbienne, fruits, PCR-DGGE, NGS.

Abstract

Globalization of trades and industrialization of food have increased the occurrence of food fraud. Cases of food contamination now have a global impact and lead to far-reaching consequences both on the economy and the health of consumers (Cubero-Leon *et al.*, 2014). Thus, fraud and authentication became important topics in the food sector. Especially as food frauds are becoming more sophisticated to bypass controls and are therefore more difficult to detect by classical approaches. Organic foods are part of foods that are the most likely to be subject of fraud. But traceability of foods is mainly performed by administrative means (UE Regulation 178/2002). That is why it is necessary to resort advanced analytical techniques to detect non-compliant products and to ensure traceability and authentication of foods, including those from organic agriculture. Our study is based on the hypothesis that treatments associated to various farming types have a measurable impact on food microflora. That is why, the main objective of this study was to use the microbial environment of foods to discriminate them according to their production mode. PCR-DGGE, a molecular tool of microbial ecology, could be used as to discriminate food production modes using bacterial and fungal rDNA profiles. The analysis of microbial genetic profiles of nectarines, peaches, bananas and apples showed that it was possible to differentiate fruits according to their farming types. It was possible to verify the robustness of our methodology by comparing results obtained on two successive harvest years. We estimated also the intra-plot variations and observed that organic apples could be discriminated from conventional ones independently upon their position in the field (centre or border) or even on the tree. The observed differences in microflora between organic and conventional apples were significant enough to conclude that the applied treatments have a significant impact on this microflora. Furthermore, the analysis of DNA sequences obtained from PCR-DGGE and NGS allowed some microbial groups (fungal and bacterial) to be identified as specific to organic foods. However, the "terroir effect" is an important criterion to take into account for the implementation of an authentication tool for organic products. So, an application in the field would be difficult to predict if it is plot-specific. This study constitutes the basis for the development of an analytical tool that could meet the needs of food industry professionals in terms of authenticity and food safety, especially to assist certifying bodies to control and authenticate organic food products. This study enabled also to enrich the existing knowledge on the microbial ecosystem of fruits from different agricultural practices.

Keywords: agricultural practices, authenticity, traceability, fraud, microbial flora, fruits, PCR-DGGE, NGS.