

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.....	1
I. Synthèse Bibliographique	4
I.1. Situation mondiale du secteur des fruits	4
I.1.1 Les producteurs clés	4
I.1.2. Le commerce de fruits frais.....	5
I.2. Les fruits tropicaux	6
I.2.1. Généralités.....	6
I.2.2. La production	7
I.2.3. Le marché des fruits tropicaux	7
I.3. Le Physalis (<i>Fruit d'Or</i>)	8
I.3.1. Description	8
I.3.2. Caractéristiques techniques du Physalis.....	8
I.3.3. Origine et histoire	9
I.3.4. Les rendements	10
I.3.5. Qualité.....	10
I.3.6. Les secteurs d'utilisation	12
I.4. Le Karité (<i>Or des Femmes</i>)	19
I.4.1. Description	19
I.4.2. Les caractéristiques techniques.....	20
I.4.3. Origine et histoire	21
I.4.4. Culture	21
I.4.5. Qualité.....	23
I.4.6. Les secteurs d'utilisation	24
I.4.7. Le marché	26
I.4.8. Le projet Européen Innovkar.....	33
I.5. Micro-organismes, origine et communauté microbienne	36
I.5.1. Micro-organismes.....	36
I.5.2. Origine de la flore microbienne des aliments	36
I.5.3. Notions générales de communauté microbienne et facteurs d'influence de la croissance.....	37
I.5.4. Est-ce qu'il existe une relation entre les communautés microbiennes et les origines géographiques ?.....	41
I.6. La traçabilité	42
I.6.1. Définition	42
I.6.2. Enjeux	43
I.6.3. Histoire	43
I.6.4. Intérêts de la traçabilité	46
I.6.5. La traçabilité agroalimentaire	49
I.7. La traçabilité agroalimentaire	53
I.7.1. Définition	53
I.7.2. Qu'est ce que permet la géotraçabilité ?.....	53
I.7.3. Objectifs	54
I.7.4. Biomarqueurs.....	56
I.8. Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne	61
I.8.1. Méthodes traditionnelles	61
I.8.2. Méthode d'analyse des flores microbiennes de culture-indépendante.....	63

I.9. Les acides nucléiques et les techniques de biologie moléculaire en communauté microbienne	63
I.9.1. Le développement des techniques moléculaires	63
I.9.2. Etude des ARN ribosomiques (ARNr)	64
I.9.3. Le choix de l'ARNr 26/28S	65
I.9.4. Les techniques moléculaires dites d'« empreinte génétique »	66
I.10. La méthode de PCR-DGGE	72
I.10.1. Principe de la PCR-DGGE	72
I.10.2. Les applications de la PCR-DGGE	77
I.10.3. Les limites de la PCR-DGGE	79
II. Matériels et Méthodes	83
II.1. Les matériels biologiques	83
II.1.1. Les souches utilisées dans cette étude.....	83
II.1.2. Échantillonnage des fruits de Karité et de Physalis	84
II.2.1.1. Échantillonnage du Karité au Mali.....	84
II.2.1.2. Échantillonnage du Karité au Sénégal.....	86
II.2.1.3. Échantillonnage du Karité au Cameroun.....	88
II.2.1.4. Échantillonnage du Physalis en Égypte	90
II.2.1.5. Échantillonnage du Physalis en Ouganda.....	91
II.2.1.6. Échantillonnage du Physalis en Colombie.....	93
II.2. Analyses physico-chimiques et chimiques du jus de Physalis (<i>Physalis pubescens</i> L.)	95
II.2.1. Teneur totale en sucres	96
II.2.2. Fractionnement des polyphénols par HPLC.....	96
II.2.3. Analyse des acides aminés.....	96
II.2.4. Détermination de la teneur en huile des jus	97
II.2.5. Composition en acides gras et calcul de l'indice d'iode.....	97
II.3. Analyse sensorielle du jus de Physalis pubescens L.	98
II.4. Analyse des activités biologiques d'extraits de Physalis	98
II.4.1. Activité antimicrobienne	98
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	112
III.1 Étude de la communauté microbienne avec la PCR-DGE	112
III.1.1. Mise au point du protocole universel d'extraction de l'ADN microbien	113
III.2. Application de la PCR-DGGE pour la détermination de l'origine géographique des fruits	141
III.2.1. Analyse de Physalis prélevés dans différentes régions	141
III.2.2. Analyse de Karité prélevés dans différentes régions africaines	152
III.2.3. Analyse de Karité de différents districts de la région de Tambacounda au Sénégal	158
III.2.4. Comparaison de la totalité des profils DGGE des fruits des différentes origines géographiques.....	163
III.2.5. Identification par séquençage des levures et des moisissures dominantes sur les fruits de Karité de la région de Tambacounda au Sénégal.....	176
III.3. Étude de la pérennité du marquage microbien	178
III.3.1. Influence de la saison sur les marqueurs «levure et moisissure»	179
III.4. Étude de la composition principale du jus de Physalis (<i>Physalis pubescens</i> L.)	183
III.4.1. Teneur en matière sèche et degré Brix du jus de Physalis	183

III.4.2. Propriétés physico-chimiques et composition chimique du jus de Physalis	183
III.4.3. Composition minérale du jus de Physalis.....	185
III.4.4. Composition en polyphénols du jus de Physalis	187
III.4.5. Composition en sucre du jus de Physalis.....	187
III.4.6. Acides aminés et composition en protéines du jus de Physalis	188
III.4.7. Teneur en huile et composition en acides gras de l'huile extraite à partir du jus de Physalis	190
III.5. Évaluation sensorielle du jus de Physalis.....	192
III.6. Étude des activités biologiques d'extraits de Physalis.....	193
III.6.1. Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques du jus de Physalis ...	193
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	195
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199
ANNEXES	
Annexe 1.....	217
Annexe 2.....	217
Annexe 3 (Les prix)	217
Annexe 4 (Les publications)	217
Annexe 4.1. (Les publications sur la détermination de l'origine géographique des fruits)	217
Annexe 4.2. (Les publications sur l'analyse des propriétés biologiques d'extraits de fruits)	217

Liste des illustrations

Chapitre I		
Figure I.1	Photos de certaines espèces de <i>Physalis</i>	9
Figure I.2	Quelques produits du <i>Physalis</i>	14
Figure I.3	Destination des exportations de <i>Physalis</i> de la Colombie vers l'UE	17
Figure I.4	Unité de Valeur d'exportation de <i>Physalis</i> de la Colombie	18
Figure I.5	L'arbre et le fruit du Karité <i>Vitellaria paradoxa</i>	21
Figure I.6	Quelques produits du Karité	26
Figure I.7	Production mondiale de noix de Karité	27
Figure I.8	Estimation de la part moyenne des principaux pays exportateurs de noix de karité dans les exportations globales entre 1961 et 2004	29
Figure I.9	Les objectifs de création de valeur ajoutée pour les producteurs et fabricants d'aliments	55
Figure I.10	Les enjeux stratégiques couverts par le géotraçabilité	56
Figure I.11	Représentation de l'ARNr de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> montrant les gènes d'intérêt 26S et 28S et les régions codantes. (A) les gènes d'ARNr 26S sont organisés différemment chez les levures et les plantes. (B) Les gènes des ARNr 28S sont spécifiques des moisissures	66
Figure I.12	andom Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	68
Figure I.13	Schéma du principe de la DGGE	74
Figure I.14	Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires	76
Chapitre II		
Figure II.1	Localisation des sites d'échantillonnage du Karité au Mali	85
Figure II.2	Localisation des sites d'échantillonnage du Karité au Sénégal	87
Figure II.3	Localisation du site d'échantillonnage du Karité au Cameroun	89
Figure II.4	Localisation des sites d'échantillonnage du <i>Physalis</i> en Égypte	91
Figure II.5	Localisation des sites d'échantillonnage du <i>Physalis</i> en Ouganda	92
Figure II.6	Localisation des sites d'échantillonnage du <i>Physalis</i> en Colombie	94
Chapitre III		
Figure III.1	Les trois principales étapes d'étude de la communauté microbienne par PCR-DGGE	112
Figure III.2	Schéma de la paroi cellulaire des champignons	114
Figure III.3	Schéma des étapes d'extraction de l'ADN global	115
Figure III.4	Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de la performance d'extraction de l'ADN des moisissures par le nouveau protocole	118
Figure III.5	Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de la	118

	performance d'extraction de l'ADN des levures par le nouveau protocole	
Figure III.6	Conditions de réaction de la PCR pour les levures	121
Figure III.7	Conditions de réaction de la PCR pour les moisissures	122
Figure III.8	Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification de l'ADN des moisissures	123
Figure III.9	Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification de l'ADN des levures	123
Figure III.10	Préparation du gel de DGGE : (1) Fabrication du gradient, A: solution de haute concentration en dénaturant (60% pour levures ou 70% pour les moisissures), B: solution à faible concentration en dénaturant (30% pour levures ou 40% pour les moisissures) + (2) Pompe péristaltique (3) sandwich des deux plaques de verre insérant le gel	125
Figure III.11	Calcul des distances par exploitation d'un gel DGGE	127
Figure III.12	Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés de l'ADN de différentes moisissures	129
Figure III.13	Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés de l'ADN de différentes levures	130
Figure III.14	Plan expérimental pour étudier la variabilité de la position des bandes et de la répétabilité des gels de DGGE	131
Figure III.15	Photo de 3 gels indépendants de DGGE d'ADN des levures extraites de deux fruits de Physalis (Minufiya/Égypte), et amplifiés lors de 3 PCR indépendantes. Chaque produit de PCR est déposé 5 fois	134
Figure III.16	Photo de gel d'agarose de vérification de l'amplification de l'ADN des levures en dilutions croissantes après incubation 48 h/30°C	137
Figure III.17	Photo de gel de DGGE des différentes concentrations de <i>Candida valida</i> ($10 - 10^6$ UFC/mL) après incubation 48 h/30°C	138
Figure III.18	Photo de gel de DGGE des différentes concentrations de <i>Aspergillus carbonarius</i> ($10^2 - 10^7$ spores/mL)	140
Figure III.19	Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de l'efficacité de l'extraction d'ADN totaux extraits de Physalis de différentes origines géographiques	142
Figure III.20	Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification d'ADN des levures extraites de Physalis de différentes origines géographiques	143
Figure III.21	Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification d'ADN des moisissures extraites de Physalis de différentes origines géographiques	143
Figure III.22	Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Physalis de différentes origines géographiques	145
Figure III.23	Analyse factorielle des profils DGGE des Physalis avec calice de 4 régions différentes d'Égypte	146
Figure III.24	Analyse factorielle des profils DGGE des Physalis sans calice de 4 régions différentes d'Égypte	147
Figure III.25	Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Physalis de différentes origines géographiques	150

Figure III.26	Analyse factorielle des profils DGGE de <i>Physalis</i> avec et sans calice de 4 régions différentes d'Égypte	151
Figure III.27	Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte en utilisant la base de données WorldClim (Hijmans <i>et al.</i> , 2005) Temp = température, Prec = précipitations	152
Figure III.28	Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Karité de différentes origines géographiques du Mali	154
Figure III.29	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraits de Karité prélevés de 2 régions différentes du Mali	155
Figure III.30	Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité de deux origines géographiques du Mali	156
Figure III.31	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité prélevés de 2 régions différentes du Mali	157
Figure III.32	Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte de Karité prélevés de 2 régions différentes du Mali	157
Figure III.33	Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	160
Figure III.34	Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	161
Figure III.35	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	162
Figure III.36	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	162
Figure III.37	Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	163
Figure III.38	Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de <i>Physalis</i> d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie	165
Figure III.39	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraites de <i>Physalis</i> d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie	166
Figure III.40	Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de <i>Physalis</i> d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie	167
Figure III.41	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de <i>Physalis</i> d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie	168
Figure III.42	Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte de <i>Physalis</i> : (A) d'Ouganda, (B) d'Égypte et (C) de Colombie	169
Figure III.43	Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Karité du Cameroun, du Mali et du Sénégal	171

Figure III.44	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraites de Karités du Cameroun, du Mali et du Sénégal	172
Figure III.45	Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité du Cameroun, du Mali et du Sénégal	173
Figure III.46	Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karités du Cameroun, du Mali et du Sénégal	174
Figure III.47	Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte du Karité : (A) du Sénégal, (B) du Cameroun et (C) du Mali	175
Figure III.48	Photo de gel de DGGE d'ADN de levures extraites de Physalis dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte	180
Figure III.49	Dendrogramme de profil DGGE d'ADN de levures extraites de Physalis dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte	181
Figure III.50	Photo de gel de DGGE d'ADN de moisissures extraites de Physalis dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte	182
Figure III.51	Dendrogramme de profil DGGE d'ADN de moisissures extraites de Physalis dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte	183

Liste des tableaux

Chapitre I		
Tableau I.1	Production mondiale de fruits de 2000-2009	4
Tableau I.2	Production des 6 grands producteurs de fruits (FAOSTAT, 2010)	5
Tableau I.3	Principaux pays exportateurs de fruits frais, en valeur (Millions \$) et en quantité (Milliers de Tonnes), 2007 (FAOSTAT, 2009)	6
Tableau I.5	Exportations mondiales de noix et de beurre de karité durant la décennie 1980 (Secrétariat de l'UNCTAD, 2006 et FAOSTAT, 2010)	19
Tableau I.6	Estimation des prix payés par certains pays acheteurs pour du karité de différentes origines (Secrétariat de l'UNCTAD et UN Comtrade «code: 120792», 2006)	31
Tableau I.7	Facteurs physico-chimiques de la croissance des micro-organismes (Association RECORD, 2002)	38
Tableau I.8	Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct (D'après Amann <i>et al.</i> , 1995)	62
Chapitre II		
Tableau II.1	Souches de levures, moisissures et bactéries utilisées dans cette étude	83
Tableau II.2	Cordonnées géographiques des lieux de récolte des fruits de Karité au Mali	84
Tableau II.3	Cordonnées géographiques des lieux de récolte des fruits de Karité au Sénégal	86
Tableau II.4	Cordonnées géographiques du site de récolte des fruits de Karité au Cameroun	88
Tableau II.5	Cordonnées géographiques des lieux de récolte des fruits de Physalis en Égypte	90
Tableau II.6	Cordonnées géographiques du lieu de récolte des fruits de Physalis en Ouganda	92
Tableau II.7	Cordonnées géographiques du lieu de récolte des fruits de Physalis en Colombie	93
Chapitre III		
Tableau III.1	Séquence des amorces pour les levures et les moisissures utilisées en PCR	119
Tableau III.2	Composition du mélange réactionnel de PCR des levures et des moisissures	120
Tableau III.3	Composition des gels de DGGE pour un gradient dénaturant de 30 à 60% (pour les levures) et 40 à 70% (pour les moisissures)	124
Tableau III.4	Valeur de la moyenne et de l'intervalle de confiance (IC au risque 5%) des distances relatives de migration pour 10 bandes présentes sur 3 gels de DGGE indépendants, les	135

	dépôts ont été répétés 5 fois sur chaque gel	
Tableau III.5	Limites de détection de la DGGE sur une culture pure de la levure <i>Candida valida</i> après incubation 48 h/30°C	136
Tableau III.6	Limites de détection de la DGGE sur une culture pure de la moisissure <i>Aspergillus carbonarius</i>	139
Tableau III.7	Températures moyennes, pluviométries annuelles et l'altitude des sites de récolte de <i>Physalis</i> d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie	170
Tableau III.8	Températures moyennes, pluviométries annuelles et l'altitude des sites de récolte de Karité du Sénégal, du Cameroun et du Mali	176
Tableau III.9	Noms des souches des levures obtenues par PCR-DGGE de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	177
Tableau III.10	Noms des souches de levures obtenues par PCR-DGGE de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal	178
Tableau III.11	Caractéristiques physico-chimiques et composition chimique du jus de <i>Physalis pubescens</i>	185
Tableau III.12	Composition minérale du jus (mg.100 g ⁻¹ base humide) de <i>Physalis pubescens</i> L	187
Tableau III.13	Composés phénoliques du jus brut de <i>Physalis pubescens</i> L	188
Tableau III.14	Composition centésimale en acides aminés du jus de <i>Physalis</i> comparée à celle recommandée par la FAO/WHO/UNU	189
Tableau III.15	Acides aminés indispensables dans le jus brut de <i>Physalis</i> comparés avec les RDAs	190
Tableau III.16	Composition centésimale en acide gras de l'huile de jus de <i>Physalis pubescens</i> comparée à celles de l'huile d'olive et de maïs	192
Tableau III.17	Évaluation sensorielle du jus de <i>Physalis</i>	193
Tableau III.18	Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques obtenus à partir de jus frais de <i>Physalis</i>	194

Liste des prix









(Annexe 3)

- ✓ **Premier prix "Ethnopharmacologie du Laboratoire Ethnopharama"** du 10^e Symposium International d'Aromathérapie & Plantes Médicinales, Grasse, France, 11, 12 et 13 Avril 2008.
- ✓ **Premier prix du Concours de Posters** du 5^e Congrès du projet européen intégré « Trace », Freising, Munich du 31 Mars au 3 Avril 2009.
- ✓ **Premier prix du Concours de Posters** du Congrès final du projet européen intégré « Trace », Autoworld, Bruxelles, Belgique, 2-3 Décembre 2009.
- ✓ **Un des 6 meilleures Posters** du 2^e Conférence du projet européen « MoniQA » et conférence internationale « émergents et la persistance des risques alimentaires: les défis analytiques et de l'impact socio-économique », Cracovie, Pologne, 8-10 Juin 2010.




Liste des publications

(Annexe 4)



1) Publiés:

-  **El Sheikha, A. F.**, Zaki, M., Bakr, A., El Habashy, M., & Montet, D. (2008). Physico-chemical properties and biochemical composition of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) fruits. Global Science Books Ltd., UK, *FOOD*, 2 (2) 124-130.
-  **El Sheikha, A. F.**, Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G., & 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 (10): 567-573.
-  **El Sheikha, A. F.**, Ribeyre, F., Larroque, M., Reynes, M., & Montet, D. (2009). Quality of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) juice packed in glass bottles and flexible laminated packs during storage at 5°C. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* (AJFAND), 9 (6): 1388-1405. Available at: <http://www.ajfand.net/Issue27/PDFs/El-Sheikha3150.pdf>
-  **El Sheikha, A. F.**, Zaki, M., Bakr, A., El Habashy, M., & Montet D. (2010). Biochemical and sensory quality of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34: 541–555.
-  **El Sheikha A. F.**, Piombo, G., Goli, T., & Montet, D. (2010). Main composition of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) fruits juice from Egypt. *Fruits* 65 (4): 255-265.
-  **El Sheikha, A. F.** (2010). Determination of the geographical origin of fruits by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *Journal of Life Sciences*, 4 (6): 9-15.
-  Montet, D., Le Nguyen, D. D., **El Sheikha, A. F.**, Condur, A., Métayer, I., & Loiseau, G. (2008). Application of PCR-DGGE in determining food origin: Cases studies of fish and fruits. Eds by Richard Glass, Wayne Martindale. Wellesbourne: AAB, *Aspects of Applied Biology*, 87: 11-22.
-  Montet, D., **El Sheikha, A. F.**, Le Nguyen, D. D., Condur, A., Métayer, I., & Loiseau G. (2010). Déterminer l'origine des aliments grâce à la biologie moléculaire. L'exemple de la PCR-DGGE. *Biofutur*, 307: 36-38. Available at: <http://www.biofutur.com/article.jsp?articleId=14291>



2) En cours d'impression:

-  **El Sheikha, A. F.**, Bouvet, J-M, & Montet, D. (2010). Biological bar-code for the determination of geographical origin of fruits by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*.
-  **El Sheikha, A. F.**, & Montet, D. (2010). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungi communities by PCR-DGGE: An application to *Physalis* fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits*.
-  **El Sheikha, A. F.**, Métayer, I., & Montet, D. (2010). A Biological bar-code for determining the geographical origin of fruit by using 28S rDNA fingerprinting of fungi communities by PCR-DGGE: an application to *Physalis* fruits from Egypt. *Food Biotechnology*.

3) Acceptés:

-  **El Sheikha, A. F.**, Bouvet, J-M., & Montet, D. (2010). Novel molecular fingerprinting for the geographical origin of fruits. *Mansoura Journal of Biology*. (**Accepté**)
-  Montet D., & **El Sheikha, A. F.** (2010). Universal biological bar-code for the determination of geographical origin of foodstuffs. *Mansoura Journal of Biology*. (**Accepté**)

4) Articles de Conférence (Proceeding Papers):

-  **El Sheikha, A. F.**, Bouvet, J-M, & Montet, D. (2010). Diversity of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *In: 17th World Congress of the International Commission of Agriculture Engineering (CIGR). Symposium on Nanotechnologies Applied to Biosystems Engineering and the Environment, Section VI: Postharvest Technology and Process Engineering. Hosted by the Canadian Society for Bioengineering (CSBE/SCGAB), 13-17 June 2010. Québec City, Canada.*
-  Sangsoponjit, S, Suphalucksana, W., **El Sheikha A. F.**, Montet, D., Jirajaroenrat, K. (2010). Monitoring of the microbial community structure in intestinal tract of chicken (*Gallus gallus*) by PCR-DGGE technique. *In: 14th AAAP Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 23-27 August 2010. Pingtung, Taiwan, Republic of China.*

5) Articles sur l'Internet (On-line):

- ◆ **El Sheikha, A. F.**, & Montet, D. (2010). New Strategies of Traceability for Determining the Geographical Origin of Foodstuffs: Creation of a biological Bar-Code by PCR-DGGE. News on TRACE website, <http://trace.eu.org/admin/news/file/Article%20TRACE-Cirad-Jan2010.pdf> (10 January 2010).

Liste des communications

Communications

● Orales:

- **El Sheikha Aly**, Le Nguyen Doan Duy, Loiseau Gérard, Montet Didier. Application de la PCR-DGGE pour la détermination de l'origine des aliments : cas du Pangasius, poisson du Viet Nam et des graines de Karité de l'Afrique Sub Saharienne. *In*: 2nd Spring of Baillarguet "Sciences and Cultures of the World", Presentation of research themes, Montpellier, France, 19 and 20 March, 2009.
- **El Sheikha Aly**, Montet Didier. Nouvelles Stratégies de Traçabilité pour Déterminer l'Origine Géographique des Aliments: Création d'un Code Barre Biologique par PCR-DGGE. Les Journées de l'UMR Qualisud, Montpellier, France, 30 Juin – 01 Juillet 2009.
- **El Sheikha Aly**, Montet Didier. New Strategies of Traceability for Determining the Geographical Origin of Foodstuffs: Creation biological Bar-Code by (PCR-DGGE). *In*: 3rd Steering Committee Meeting of INNOVKAR European Project, Kampala, Uganda, 6th - 10th July 2009.
- **El Sheikha Aly**, Bouvet Jean-Marc, Montet Didier. Determination of the geographical origin of fruits by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *In*: 2nd International Conference on Biological & Environmental Sciences, Mansoura & Luxor, Egypt, 15-20 March 2010.
- **El Sheikha Aly**, Bouvet Jean-Marc, Montet Didier. Biological bar-code for the determination of geographical origin of fruits by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *In*: 2nd MoniQA International Conference "Emerging and persisting food hazards: Analytical challenges and socio-economic impact", Krakow, Poland, 8 - 10 June 2010.
- **El Sheikha Aly**, Bouvet Jean-Marc, Montet Didier. Diversity of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *In*: 17th World Congress of the International Commission of Agriculture Engineering (CIGR). Symposium on Nanotechnologies Applied to Biosystems Engineering and the Environment, Section VI: Postharvest Technology and Process Engineering. Hosted by the Canadian Society for Bioengineering (CSBE/SCGAB), Québec City, Canada, 13-17 June 2010.

● Posters:

- **El Sheikha Aly**, Zaki Mohammed, Montet Didier, Larroque Michel, Pelissier Yves. Cerise de Terre (*Physalis pubescens* L.). 10th International Symposium of Aromatherapy and Medicinal Plants, Grasse, France, 11, 12 and 13 April 2008.
- **El Sheikha Aly**, Condur Ana, Le Nguyen Doan Duy, Loiseau Gérard, Montet Didier. Analyse de la diversité des populations microbiennes des aliments. The days of UMR Qualisud, Montpellier, France, 19-20 June 2008.
- **El Sheikha Aly**. Physalis Fruits from Paradise. Trace 5th Annual Meeting and International Conference entitled: "TRACE in practice (New methods and

systems for confirming the origin of food)", Freising near Munich, Germany, 1st - 3rd April 2009.

- **El Sheikha Aly**. Shea Tree Fruits The Gold of Women. Trace 5th Annual Meeting and International Conference entitled: "TRACE in practice (New methods and systems for confirming the origin of food)", Freising near Munich, Germany, 1st - 3rd April 2009.
- **El Sheikha Aly**, Le Nguyen Doan Duy, Métayer Isabelle, Montet Didier. Nouvelles Stratégies de Traçabilité pour Déterminer l'Origine Géographique des Fruits: Création d'un Code Barre Biologique par PCR-DGGE. La journée de l'École Doctorale SPSA, Montpellier, France, 18 June 2009.
- **El Sheikha Aly**, Chalier Christophe, Montet Didier, Zaremski Alba. Determination the geographical origin of tropical timber by using innovative traceability tool "PCR-DGGE". International Conference Knowledge-Based Management of Tropical Rainforests, French Guiana, 22-28 November 2009.
- **El Sheikha Aly**, Chalier Christophe, Montet Didier, Zaremski Alba. Determination the geographical origin of tropical timber by using innovative traceability tool "PCR-DGGE". TRACE Final Conference entitled: "How to trace the origin of food?". Autoworld, Brussels, Belgium, 2-3 December 2009.
- **El Sheikha Aly**, Montet Didier. Universal biological bar-code for determining the geographical origin of fruits by using PCR-DGGE. PhyloCom "A symposium on the phylogeny of communities", Montpellier, France, 3 May 2010.
- **El Sheikha Aly**, Montet Didier. Nouvel outil moléculaire de détermination de l'origine géographique des aliments et des points critiques microbiens pour les usines agro-alimentaires. Journée AGORIALES, Palais des expositions de Villepinte, Paris, France 18 Octobre 2010.

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ADNr 16S	ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal
ADNr 26S	ADN codant pour la sous unité 26S de l'ARN ribosomal
ADNr 28S	ADN codant pour la sous unité 28S de l'ARN ribosomal
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomale
BET	Bromure d'éthidium
CE	Communauté Européenne
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO	Di methyl sulfoxyde
dNTP	Deoxynucléotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
CE	Communauté Européenne
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
kb	Kilo paires de bases
MATAB	Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide
p/v	Poids per volume
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Length Fragment Polymorphism
S	Svedberg
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSCP	Single-Stranded Conformation Polymorphism
TAE	Tris/ Ammonium/ EDTA (tampon)
TE	Tris/ EDTA (tampon)
TEMED	N, N, N', N' Tétraméthyléthylènediamine
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis

Tm	Température de fusion
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant Colonie
UNCTAD	United Nations Conference on Trade and Development
v/v	Volume per volume

RapportGratuit.com

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le commerce international des fruits vers les pays riches est crucial pour la satisfaction du consommateur qui demande tout à la fois, et en particulier des produits de qualité, à prix raisonnable et disponibles toute l'année. Il doit répondre également aux contraintes de volumes et de garanties sanitaires de la distribution européenne, dont les achats sont souvent centralisés (Codron *et al.*, 2009). Suite aux nombreuses crises particulièrement dans le secteur agroalimentaire tel que récemment la vache folle, la listériose ou la grippe aviaire...etc., les consommateurs sont devenus de plus en plus sensibles à l'origine et à la qualité des produits qu'ils achètent. La logistique de ce secteur doit donc pouvoir faire preuve de réactivité, de précision ainsi que de transparence. De nombreuses mutations ont bouleversé le paysage des logistiques agroalimentaires telles que l'apparition de nouvelles réglementations internationale, les labels, ou encore les innovations technologiques (Bricout *et al.*, 2009).

Au cours des sept dernières années, les échanges commerciaux et la consommation des fruits ont augmenté très rapidement. A cet égard la valeur totale des échanges internationaux des fruits frais pour tous les exportateurs a été de plus de 23,6 milliards \$ en 2007 et continue de croître rapidement. Les exportations de fruits frais ont plus que doublé en valeur depuis 2003 (4,8 milliards \$), pour atteindre 10 milliards \$ en 2007, elles ont augmenté en de près de 37% depuis 2000. En termes de quantité, les exportations ont presque doublé depuis 2000 et ont augmenté de 24% depuis 2000 (FAOSTAT, 2009).

La traçabilité des produits alimentaires est aujourd'hui devenue, avec la sureté, une préoccupation constante pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire (Règlement CE 178/2002). Les producteurs, transformateurs, distributeurs doivent identifier et résoudre les points critiques, respecter la réglementation, effectuer des autocontrôles; les services publics doivent établir et faire respecter les réglementations relatives à la maîtrise de l'hygiène; les consommateurs doivent être informés de la nature des produits et des problèmes sanitaires (Règlement CE 2073/2005 et CE 178/2002).

Compte tenu de la difficulté à mettre en place des systèmes d'identifications enregistrées le plus souvent documentaire dans les pays du Sud et la difficulté de suivre le cheminement des aliments, le CIRAD (Centre de coopération internationale

en recherche agronomique pour le développement) a décidé de financer des travaux de recherche visant à identifier et mettre en œuvre une méthode utilisant la PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction–Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pour analyser la totalité des flores microbiennes présentes sur les fruits en une seule analyse afin d'établir un code barre biologique permettant de déterminer l'origine géographique des fruits importés. L'hypothèse de départ de ce projet était de relier les communautés microbiennes (moisissures, levures) à l'origine géographique des fruits en utilisant la PCR-DGGE comme un outil de traçabilité innovant, efficace et rapide (résultats en 24 h) donnant au produit alimentaire une empreinte génétique unique . De plus cette technique propose la possibilité d'analyser une grande quantité d'échantillons (30 échantillons) en une seule analyse.

La première phase de ce projet a été consacrée à la mise au point et au développement de deux nouvelles techniques de biologie moléculaire d'analyse des flores de levures et de moisissures. Cette technique appliquée à ces deux familles de microorganismes n'a jamais été publiée par d'autres équipes. L'originalité de cette méthode est qu'elle est basée sur l'extraction en une seule étape des ADN totaux des flores microbiennes (bactéries, levures ou moisissures) des fruits et de leur caractérisation de leur ADN après amplification et électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Un premier travail a permis de valider l'hypothèse de départ et de standardiser la méthode sur les souches pures des levures et moisissures. La méthode a ensuite été appliquée sur des fruits (Karité, Physalis).

Notre travail de thèse s'insère dans le cadre d'un projet européen géré par le Cirad dont le coordinateur est le Dr. Jean-Marc BOUVET. Le projet global, financé par l'Union Européenne, est un projet INCO du 6^{ème} PCRD, intitulé Innovkar «Outils innovants pour soutenir l'utilisation durable de l'arbre de karité» (U.E. projet n°032037). Le sujet de la thèse est issu du Work Package N°6 intitulé «Méthodes pour la traçabilité des produits de l'arbre de karité».

La production mondiale de noix de karité est concentrée en Afrique à l'intérieur d'une bande de 5000 km s'étendant de l'Afrique de l'Ouest jusqu'au Soudan. La production mondiale de noix de karité a nettement progressé depuis les années 1960. Elle enregistrait un niveau de 169'000 tonnes environ en 1961 contre 693'000 en 2005. La majeure partie de la consommation de karité se fait à l'échelon national, local, voire au sein de la cellule familiale. Cette consommation, qualifiée

d'autoconsommation, n'est pas prise en compte dans les statistiques officielles (UNCTAD, 2006).

La production de karité étant saisonnière, nous avons consacré le reste du temps de la thèse à appliquer et valider les méthodes développée sur le fruit de Physalis. Aujourd'hui, l'importance économique du Physalis est en hausse en raison de sa grande acceptation dans la consommation locale et son succès sur les marchés internationaux. Le Physalis est inclus dans la liste prioritaire de nombreux gouvernements et dans les plans d'exportation de fruits. Il est relativement inconnu par les marchés d'importation et demeure un fruit exotique. Les fruits du Physalis sont consommés crus pour leur gout agréable, unique et bien fleuri et leur saveur aigre-douce se rapprochant du gout du mélange tomate/ananas. En Égypte, le Physalis est connu depuis le XVI^e siècle, sous le nom d'une de ses variétés «Alkékenge» (dérivé de l'Arabe Al-Kâkang). L'Égypte est un des grands producteurs, consommateurs et exportateurs de Physalis (El Sheikha *et al.*, 2010e). Pour des raisons économiques et de rentabilité, plusieurs lots de fruits d'origines diverses ou de divers cultivars peuvent être mélangés. La détermination de l'origine géographique des produits est donc difficile.

Les deux principales questions de recherche auxquelles nous avons voulu répondre sont :

1. Est-ce que les empreintes génétiques des flores de levures et de moisissures présentes sur les fruits, obtenues par les profils de DGGE, peuvent être utilisées pour relier la communauté des souches microbiennes à l'origine géographique des fruits ?
2. Pourquoi le fruit du Physalis, de par sa composition et ses qualités, est considéré comme le « fruit d'or »?

Les objectifs de ce travail sont donc :

1. De valider la méthode de PCR-DGGE, créée pour relier la communauté bactérienne à l'origine géographique des poissons d'aquaculture, aux flores de levures et de moisissures présentes sur des fruits provenant de différents sites de plusieurs pays.
2. De vérifier la pérennité des profils électrophorétiques au cours des saisons.
3. D'attirer l'attention sur l'importance des fruits du Physalis.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**I.1. Situation mondiale du secteur des fruits**

En 2009, la production mondiale est supérieure de 10,48% à celle de 2000 (Tableau I.1). La production mondiale de fruits a augmenté en moyenne de 2,58% par an entre 2000 et 2005 puis comparativement à un taux de croissance moyen de 0,33% par an pour la période 2005-2009 (FAOSTAT, 2010).

Tableau I.1 : Production mondiale de fruits de 2000-2009 (FAOSTAT, 2010)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Production	(millions de tonnes)									
Fruits frais	22,4	23,4	23,7	24,4	23,2	25,2	26,2	25,7	26,8	27,6

I.1.1 Les producteurs clés

Le tableau I.2 identifie les principaux producteurs de fruits frais. L'Inde est le premier producteur mondial de fruits et produit 28,9% des fruits mondiaux en 2009. La Chine est le deuxième producteur au monde, avec 7,9%. L'Indonésie est le troisième producteur de fruits avec 5,1% de la production mondiale en 2009. Comme on peut le voir sur la figure 2, la production est en augmentation en Azerbaïdjan à un rythme beaucoup plus rapide que dans les autres principaux pays producteurs. La croissance de sa production moyenne est de près de 8% par an au cours de la période 2000-2009, tandis que la croissance de production en Inde est en moyenne de 3,6% par an. L'Union Européenne a connu un taux de croissance annuel de 2,9% pendant la période 2000 à 2009.

Les autres grands producteurs sont la Chine, l'Indonésie et l'Égypte. La production en Égypte fut constante au cours de la période 2000 – 2009. Seules l'Indonésie et la Chine ont eu une baisse de production de 5,5% et 2,9%, respectivement.

Tableau I.2 : Production des 6 grands producteurs de fruits (FAOSTAT, 2010)

	2000	2009	Taux de croissance annuel moyen (%)
	(Tonnes)		
Pays			
Producteurs			
Inde	5.750.000	7.984.000	3,6
Chine	1.539.048	2.181.744	- 2,9
Indonésie	922.000	1.400.000	- 5,5
Union Européenne	377.095	457.646	2,9
Égypte	350.000	350.000	0,0
Azerbaïdjan	109.000	202.055	8,2
Total monde	22385191	27.627.853	2,0

1.1.2. Le commerce de fruits frais

La valeur totale des exportations mondiale de fruits frais a été de plus de 23,6 milliards \$ en 2007 et continue de croître rapidement. Les exportations de fruits frais ont plus que doublé en valeur depuis 2003 (4,8 milliards \$), pour atteindre la valeur 10 milliards \$ en 2007, et ont augmenté en dollars de près de 37% depuis 2000. En termes de quantité, les exportations ont presque doublé depuis 2000 et ont augmenté de 24% depuis 2000 (FAOSTAT, 2009).

Le marché des exportations est en grande partie attribuable à la demande des consommateurs qui a augmenté et au développement des technologies qui ont facilité le commerce des fruits frais. La consommation de fruits frais est en augmentation en Chine comme à l'étranger et devrait continuer à augmenter. De plus, les consommateurs sont prêts à payer des prix plus élevés pour les fruits hors saison. L'invention et l'adoption de nouveaux modes de transport et le développement des technologies à atmosphère contrôlée permettent aux fruits frais de voyager sur de plus grandes distances, tout en conservant leur fraîcheur et offrant aux consommateurs un plus grand choix de fruits frais de qualité toute l'année.

Le marché d'exportation des fruits frais est très compétitif. L'accès aux marchés étrangers est essentiel pour les pays qui sont de gros producteurs. Les accords de libre-échange sont un moyen efficace de fournir un accès aux marchés et

encourager les exportations. Différentes techniques de marketing sont également utilisées pour promouvoir les exportations et pour accroître les parts de marché sur les marchés étrangers.

Le tableau I.3 présente les principaux exportateurs de fruits frais, en valeur et en quantité, en 2008.

Tableau I.3. : Principaux pays exportateurs de fruits frais, en valeur (Millions \$) et en quantité (Milliers de Tonnes), 2008 (FAOSTAT, 2010)

	Exportations - Quantité (Milliers de Tonnes)	Exportations - Valeur (Millions \$)
Pays		
Viet Nam	303 190	127 275
Thaïlande	213 417	119 295
Azerbaïdjan	119 084	57 997
Espagne	76 822	128 359
Chine	75 936	41 877
Inde	59 668	34 766
Pays-Bas	52 418	192 754
Ouzbékistan	48 472	33 241
Total monde	1 412 799	1 248 652

I.2. Les fruits tropicaux

I.2.1. Généralités

La production et le commerce mondiaux des fruits tropicaux frais devraient croître au cours de la prochaine décennie. La production des pays en développement représente environ 98% de la production mondiale et les importations des pays développés 80% du commerce mondial. La production des fruits tropicaux principaux constitue environ 75% de la production mondiale de fruits tropicaux frais. La mangue est le fruit tropical le plus échangé à l'échelle mondiale, suivie par l'ananas, la papaye et l'avocat. Ces produits sont ici désignés par l'expression «fruits tropicaux principaux». Les autres fruits comme le litchi, le durian, le ramboutan, la goyave et le fruit de la passion sont appelés «fruits tropicaux secondaires»; la production et le commerce des fruits tropicaux secondaires sont

nettement moins importants que ceux des fruits tropicaux principaux, mais leur part de marché a rapidement augmenté ces dernières années.

1.2.2. La production

La production mondiale des fruits tropicaux principaux devrait atteindre 62 millions de tonnes en 2010, soit 15,4 millions de plus que durant la période de base (1998-2000). La production des pays en développement devrait continuer de représenter 98% de la production mondiale et celle des pays développés 2%. Le taux de croissance, projeté sur dix ans (entre la période de base et 2010) est de 2,6%; il est moins élevé que le taux de croissance annuel moyen enregistré ces dernières années, mais conforme aux hypothèses actuelles et à la tendance passée. La majeure partie de l'accroissement de la production de ces dernières années est imputable à l'expansion des superficies cultivées pour l'exportation.

En 2010, la région Asie et Pacifique devrait toujours être la première région de production du monde, avec un peu plus de 56% de la production mondiale, suivie par la région Amérique latine et Caraïbes (32%) et par l'Afrique (11%). La production des États-Unis, de l'Europe et de l'Océanie constitue le pour cent restant de la production mondiale. La part des pays en développement dans la production mondiale de fruits tropicaux devrait encore augmenter, et passer de près de 96 % en 1988 à 99% en 2010. L'essentiel de l'augmentation projetée de la production mondiale d'ici à 2010 sera imputable à l'Amérique latine et aux Caraïbes, tandis que la production de l'Afrique et de la région Asie-Pacifique devrait stagner ou légèrement diminuer (FAO, 2010).

1.2.3. Le marché des fruits tropicaux

La demande en fruits frais tropicaux au cours de la prochaine décennie devrait être soutenue et l'on prévoit, pour les principaux fruits tropicaux, un taux de croissance composé de près de 8% sur la période de projection. Les importations mondiales devraient atteindre 4,3 millions de tonnes en 2010. La Communauté Européenne devrait rester le premier importateur, suivie par les États-Unis, et leurs parts cumulées devraient constituer 70% de la demande d'importation. L'Europe devrait rester le premier débouché pour les fruits tropicaux, la France étant un importateur majeur et le premier pays européen de transit des fruits importés.

Ces dernières années, les prix des fruits tropicaux ont eu tendance à baisser car l'offre a augmenté, et il y a eu des fluctuations importantes des prix selon les variétés et les saisons. La demande d'importation des principaux fruits tropicaux est déterminée essentiellement par la qualité et le prix alors que dans le cas des fruits tropicaux secondaires, la nouveauté a plus d'influence sur les choix des consommateurs (FAO, 2010).

I.3. Le Physalis (*Fruit d'Or*)

I.3.1. Description

Parmi les fruits tropicaux inexploités, le Physalis ou cerise de terre est un fruit très prometteur (El Sheikha, 2004). L'importance économique du Physalis est en train d'augmenter, du à sa forte acceptation locale, ce qui lui promet un grand succès sur les marchés Africain, Latin Américain et Européen (El Sheikha *et al.*, 2008 a,b). Le Physalis est un genre important de la famille des Solanacées Le genre Physalis, créé par Linné en 1753, contient environ 463 espèces, mais moins de 100 espèces sont bien connues et ont des noms aussi fantaisistes que l'amour en cage, la tomate balle, les baies dorées, la cerise de terre, pok pok, les tomates aux fraises, ou encore le coqueret pubescent (El Sheikha, 2004). Il a un remarquable potentiel agronomique qui n'a pas été pleinement apprécié. Le développement des pratiques adéquates en matière agro-techniques et de stockage pourrait transformer les fruits de Physalis en une culture prometteuse et rentable pour les régions arides (El Sheikha *et al.*, 2010e).

I.3.2. Caractéristiques techniques du Physalis

Le Physalis est une plante herbacée annuelle. L'arbuste peut atteindre 45 cm. Le système racinaire est fibreux. La plante a des feuilles ovales de 4-9 cm, jaunâtres, tachetées foncées. Les fleurs sont en forme de cloche. Les fruits font de 1 à 5 cm de diamètre, ont la peau jaune or, vert, pourpre en fonction de la variété. Le calice est en partie ou entièrement clos et forme une grande enveloppe comme du papier contenant de nombreuses graines dans une pulpe juteuse, sucrée et acidulée (El Sheikha, 2009a). La Figure I.10 montre des photos de certaines espèces de Physalis.

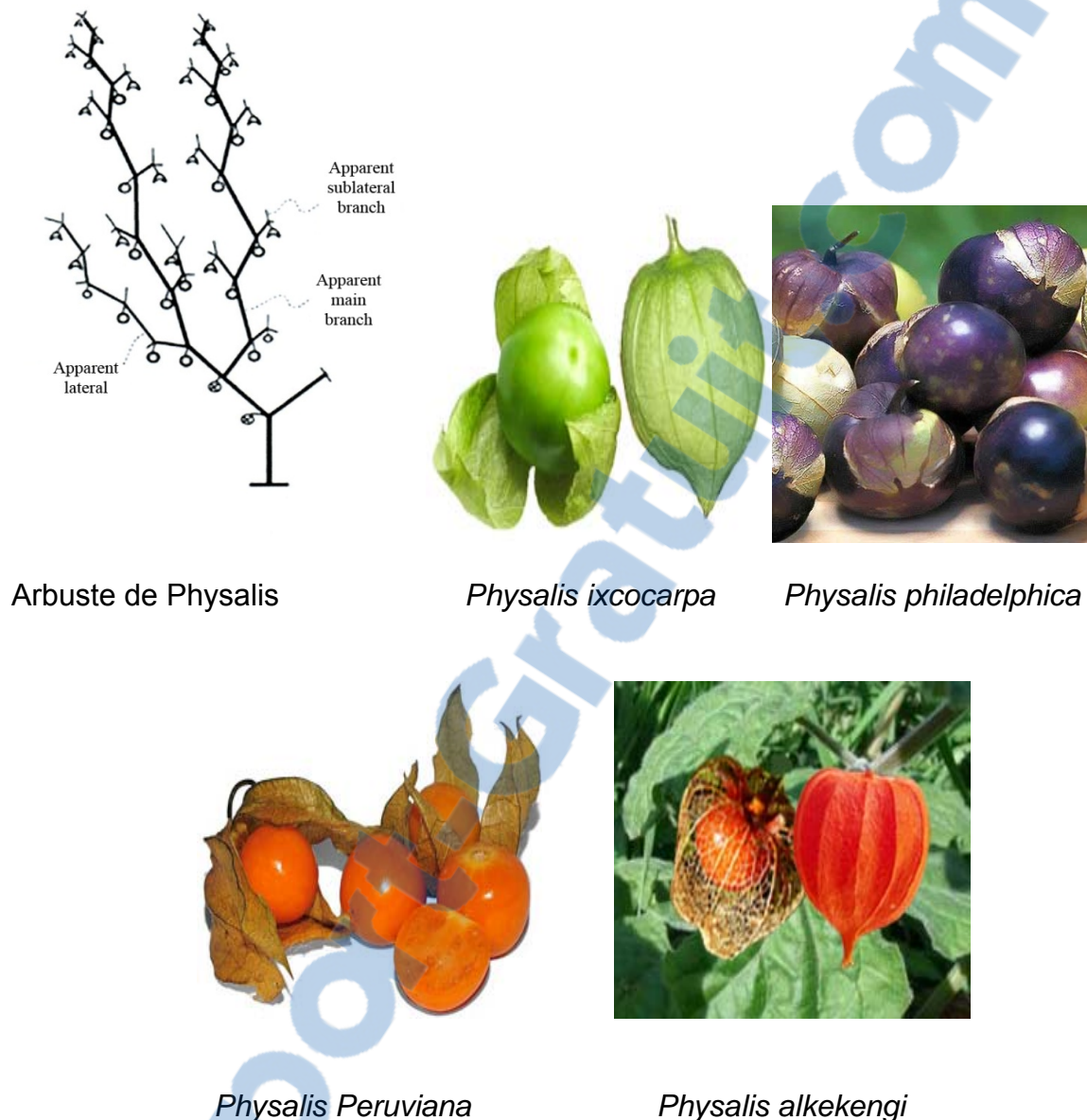


Figure I.1 : Photos de certaines espèces de Physalis
(Source: El Sheikha, 2004)

I.3.3. Origine et histoire

Le genre *Physalis*, est connu des botanistes depuis des centaines d'années. A titre d'exemple, *Physalis philadelphica* L. est l'une des espèces de *Physalis* connue par les taxonomistes depuis plus de 400 ans (Moriconi *et al.*, 1990). Il est originaire d'Amérique tropicale et subtropicale et est largement diffusé à travers le monde. Le *Physalis* peut être trouvé dans la plupart des continents sous les tropiques, notamment en Afrique, en Asie et dans les Amériques. Il s'est adapté dans les régions tropicales du monde entier (y compris Hawaii) et il a été largement introduit

en culture dans d'autres régions tropicales, subtropicales et même des zones tempérées (El Sheikha, 2004).

Abou-Gharbia et Abou-Tour (2001) ont signalé que le *Physalis* est cultivé en Égypte dans des zones limitées à proximité de grandes villes et il peut être cultivé aussi dans le sud de El-Wady, dans de nouvelles régions comme «Toshki», dont les sols sableux ont été nouvellement endigués; le gouvernement de Qalyoubia, en particulier dans la région de Shibin El-Kanatr Centre; le gouvernorat de Guizeh, en particulier dans Embaba Centre, et plus précisément dans le village de Wrdan et certaines régions du gouvernement de Behaira.

Chaque année, les 9 et 10 Juillet, les Japonais organisent un festival d'été au temple Senso-ji à Asakusa, pour commémorer le *Physalis* qu'ils appellent Hozuki. Ainsi, cet événement de deux jours est communément appelé Hozuki Ichi, ou Cerise de Terre (El Sheikha, 2009a).

1.3.4. Les rendements

Les plantes individuelles peuvent produire de 64 à 200 fruits par saison. Dans les plantations d'essai à Ames et dans l'Iowa, le rendement en fruits en moyenne est de 1,1 kg par plante, ce qui équivaut à environ 9 tonnes à l'acre. En Inde, les rendements sont de 7,5 à 10 tonnes par acre (Facciola, 1990). Au Mexique, le rendement des types "criollas" est d'environ 15.000 kg/ha et le rendement du cultivar «Rendidora» est d'environ 25.000 kg/ha (Moriconi *et al.*, 1990).

En Égypte, une seule plante soigneusement entretenue peut produire jusqu'à 0,5 à 1,1 kg de fruits de *Physalis* (12 tonnes/ha).

1.3.5. Qualité

La norme CODEX STAN 226, 2001 vise les variétés commerciales de *Physalis* issues du *Physalis peruviana* L., de la famille des Solanaceae, destinées à être livrées à l'état frais au consommateur, après conditionnement et emballage, à l'exclusion des *physalis* destinées à la transformation industrielle.

1.3.5.1. Caractéristiques minimales

Étant donné la petite taille du marché du *Physalis* et surtout, son faible degré d'organisation, aucune norme n'a encore été définie à ce sujet au niveau

international. Par contre, compte tenu de dispositions particulières prévues pour chaque catégorie et des tolérances admises, les physalis doivent être:

- entiers avec ou sans calice;
- sains; sont exclus les produits atteints de pourriture ou d'altérations les rendant impropres à la consommation;
- propres, pratiquement exempts de matières étrangères visibles;
- pratiquement exempts de ravageurs affectant l'aspect général du produit;
- exempts d'humidité extérieure anormale, exception faite de la condensation qui apparaît lors du retrait des chambres froides;
- exempts de toute odeur et/ou saveur étrangères;
- fermes;
- d'aspect frais;
- d'apparence lisse et brillante.

Si le calice est présent, le pédoncule ne doit pas dépasser 25 mm de longueur.

1.3.5.2. Critères de sélection pour le transport

Le développement et l'état des Physalis doivent être tels qu'ils leur permettent: de supporter le transport et la manutention; et d'arriver dans des conditions satisfaisantes au lieu de destination.

La maturité des physalis peut être évaluée visuellement d'après leur coloration extérieure, qui passe du vert à l'orange à mesure que le fruit mûrit. Elle peut être confirmée par la teneur en solides solubles.

- La modification de la couleur du calice n'indique pas le mûrissement du fruit.
- La teneur en solides solubles doit être d'au moins 14,0°Brix.

1.3.5.3. Classification

Les Physalis sont classés en trois catégories, indépendamment de leur taille et de leur couleur, comme suit:

* Catégorie «Extra»: Les Physalis de cette catégorie doivent être de qualité supérieure. Ils doivent présenter les caractéristiques de la variété et/ou du type commercial. Ils doivent être exempts de défauts, à l'exception de très légères altérations superficielles, à condition que celles-ci ne portent pas atteinte à l'aspect général du produit, à sa qualité, à sa conservation ou à sa présentation dans l'emballage.

* Catégorie I: Les Physalis de cette catégorie doivent être de bonne qualité. Ils doivent présenter les caractéristiques de la variété et/ou du type commercial. Ils peuvent toutefois présenter les légers défauts suivants, à condition que ceux-ci ne portent pas atteinte à l'aspect général du produit, à sa qualité, à sa conservation ou à sa présentation dans l'emballage: légers défauts de forme, de couleur; épidermiques; Ces défauts ne doivent en aucun cas affecter la pulpe du fruit.

* Catégorie II: Cette catégorie comprend les Physalis qui ne peuvent être classés dans les catégories supérieures, mais correspondent aux caractéristiques minimales définies ci-dessus. Ils peuvent toutefois présenter les défauts suivants, à condition que les physalis conservent leurs caractéristiques essentielles de qualité, de conservation, l'aspect général et de présentation:

- légers défauts de forme, de couleur; épidermiques;
- légères craquelures cicatrisées ne couvrant pas plus de 5% de la surface totale du fruit.

Ces défauts ne doivent en aucun cas affecter la pulpe du fruit.

1.3.6. Les secteurs d'utilisation

Au cours de l'histoire, les hommes ont employé environ 3000 espèces de plantes pour leur alimentation pour arriver aujourd'hui à n'en utiliser seulement une vingtaine d'espèces qui fournissent la majeure partie de la nourriture du monde. Beaucoup d'espèces de plantes intéressantes d'un point de vue nutritionnels sont sous-utilisées (Vietmeyer, 1986). En effet, des vestiges de *Physalis spp* utilisés comme denrées alimentaires ont été trouvés lors de fouilles dans la vallée de Tehuacán (900 BC-AD 1540). Au XVI^e siècle, les Physalis étaient parfumés et portés sur les parures des femmes indigènes au Pérou. Ils ont aussi largement utilisé la plante entière (fruits, feuilles, racines, sève) dans leur médecine populaire, et à l'état sauvage en Europe, Amérique et Asie (El Sheikha, 2004).

1.3.6.1. Utilisation du Physalis comme aliment

Les fruits du Physalis sont consommés crus pour leur goût agréable, unique et bien fleuri et leur saveur aigre-douce ressemblant au mélange tomate/ananas. Le fruit du Physalis est très nutritionnel en raison de sa richesse en vitamine A, B, C. Il est une riche source de carotène, de phosphore et de fer, et contient également de la vitamine P. Il peut être consommé frais, en salade ou en cocktails.

Quatre espèces sont cultivées dans différentes parties du monde pour leurs fruits: *Physalis peruviana* L. (Coqueret du Pérou, Uchuba) et *Physalis pruinosa* L. (Cerise de Terre, Tomate Balle) sont utilisés comme des fruits de confiture; *Physalis alkekengi* L. (Lanterne Chinoise) est utilisé comme plante ornementale et *Physalis ixocarpa* Brot. (Tomatillo, Tomate de Cascara) est utilisé comme un légume ou pour préparer des sauces.

Les Européens apprécient les fruits de *Physalis*, trempés dans du chocolat ou utilisés pour décorer les gâteaux et les tartes. Il s'agit d'un ingrédient intéressant pour les salades, plats cuisinés, desserts, confitures, gelées, marmelades, naturel et snacks. Le *Physalis* peut être utilisé comme denrée alimentaire dans de nombreux plats tels que: frites, soupes et cuit avec de la viande. *Physalis ixocarpa* et *Physalis philadelphica* ont été un élément constant de l'alimentation mexicaine et guatémaltèque jusqu'à nos jours, principalement sous forme de sauces préparées avec des piments pour améliorer la saveur du repas et stimuler l'appétit. Le fruit de *Physalis ixocarpa* est utilisé cuit, ou même cru, préparé en purée ou avec des viandes hachées sous forme de base pour les sauces chili connue génériquement comme la salsa verde (sauce verte). Une infusion de l'enveloppe (calices) est ajoutée à la pâte Tamale, pour améliorer sa consistance spongieuse, ainsi qu'à celles de beignets: il est aussi utilisé pour donner de la saveur au riz blanc et pour attendrir les viandes rouges. Au Mexique, les fruits sont utilisés dans la fabrication de la sauce chili et les sauces pour les plats populaires tels que les tacos et enchiladas (El Sheikha, 2004). La figure I.2 montre certains produits de *Physalis*.



Figure I.2 : Quelques produits du Physalis
(Source: El Sheikha, 2009a)

Le Physalis ou "*Harankash*" est l'un des goûters traditionnels en Égypte. Les fruits sont considérés comme très nutritifs et peuvent être un supplément non négligeable à l'apport quotidien en nutriments d'un enfant. Mais le potentiel nutritionnel de ce fruit commence à peine à être exploré en Égypte (Wassef, 2004).

1.3.6.2. Utilisations médicales et éthnomédicales

Le Physalis était autrefois très prisé par les médecins arabes comme plante médicinale pour le traitement des maladies rénales (surement pour la désintégration des calculs rénaux) et les maladies des voies urinaires et semblait important dans l'activation des fonctions hépatiques (Stray, 1983).

De nombreuses propriétés médicinales ont été attribuées au Physalis comme antipyrétique, dépuratoire, diurétique, pectorale et vermifuge. Une décoction est employée dans le traitement des abcès, de la toux, des fièvres ou de la gorge endolorie (Duke et Ayensu, 1985). Par la suite, l'isolement et la caractérisation de plusieurs withanolides bioactifs à partir des plantes entières ont été signalés (Ahmed *et al.*, 1999). Ces molécules actives ont été classées sous le nom de Physalines.

Activités Antimicrobienne, Antivirale et Antimycobactérienne:

1. Antiviral: Herpès (HSV-1), Poliomyélite, Rougeole (Kurokawa, 1993).

2. Antimicrobien: *Escherichia coli* O157:H7, et *Fusarium solani* (El Sheikha *et al.*, 2008).
3. Antimycobactérien: Utilisation des Physalines contre *Mycobacterium tuberculosis* (Januário *et al.*, 2002).

Activités Cytotoxiques, Antitumorale et Antileucémique:

1. Activité cytotoxique des Physalines et des composés reliés contre les cellules hela (Kawai, *et al.*, 2002).
2. Activité antitumorale des Physalines contre les cellules de cancers humains du sein (Chiang, *et al.*, 1992).
3. Antileucémique: Effets inhibiteurs des Physalines sur diverses cellules leucémiques (Chiang, *et al.*, 1992).

Actions Immunomodulatrices: Les Physalines inhibent les lymphocytes et évitent les rejets allogéniques des greffes (Soares *et al.*, 2006).

Actions Antioxydantes et Anti-Cholestérolémiantes: Effet d'extraits de *Physalis* comme antioxydant sur le système plasmatique et sur le taux de lipides (Choi et Hwang, 2005 ; Wu *et al.*, 2005).

El Sheikha *et al.* (2008b) ont signalé les utilisations ethnomédicales dans le monde suivantes:

- Brésil: asthme, purification du sang, dermatite, otites, fièvre, problèmes de vésicule biliaire, problèmes rénaux, jaunisse, troubles du foie, paludisme, nausées, rhumatismes, maladies de la peau, insuffisance urinaire.
- Amérique centrale: fièvre, gonorrhée, paludisme, maladies de peau.
- Colombie: asthme, infections bactériennes, inflammations, maladies de peau.
- Japon: rhume, fièvre, mal de gorge, gonflement, insuffisance urinaire.
- Pérou: asthme, infections bactériennes, diabète, maux d'oreille, hépatite, infection (post-partum), inflammations, démangeaisons, jaunisse, troubles hépatiques, paludisme, rhumatismes, maladies de la peau, insuffisance urinaire, vers.
- Taiwan: cancer, fièvre, hépatite, maladie du foie, tumeurs, insuffisance urinaire.
- Trinité: infections bactériennes, fièvre, indigestion, néphrite, rectite.
- Surinam: gonorrhée, jaunisse, paludisme, néphrite, insuffisance urinaire.

1.3.6.3. La production

La Colombie est le premier pays producteur de Physalis dans le monde, 12'000 tonnes sont produites chaque année pour une superficie totale de 800 hectares. Le Physalis est produit dans cinq départements en Colombie (Antioquia, Boyacá, Caldas, Cundinamarca et Tolima), bien que Cundinamarca (département de la capitale) accueille 80% de la superficie cultivée (Bayer Crop Science 2006). La production totale en Égypte a augmenté pour atteindre 1000 tonnes en 2006 (CAPMAS, 2006).

1.3.6.4. Le commerce international

Le Physalis est exporté depuis plusieurs pays dont la Colombie, Équateur, Égypte, Mexique, Costa Rica, le Zimbabwe, le Kenya et l'Afrique du Sud, mais la Colombie se distingue comme l'un des plus grands producteurs, consommateurs et exportateurs.

En Colombie: le Physalis occupe la deuxième position dans la liste prioritaire de 15 fruits exportables: les exportations de cette culture en 2004 se sont élevées à 14 millions USD. Seulement 20% de la production est destinée à la consommation locale, la majorité est exportée principalement vers l'Allemagne, les Pays bas et la France.

Les colombiens ont développé une expertise particulière dans l'approvisionnement du commerce international. Les fruits colombiens dominent maintenant l'offre en Europe (figure I.3). Récemment, la production du Zimbabwe est aussi devenue disponible, avec un accueil mitigé, et les producteurs du sud de l'Europe, notamment en Espagne et au Portugal, seraient prêts à expérimenter cette production.

Il n'existe pas de statistiques sur les importations de l'UE car les autorités douanières enregistrent le Physalis dans une catégorie générale des fruits non spécifiée ailleurs.

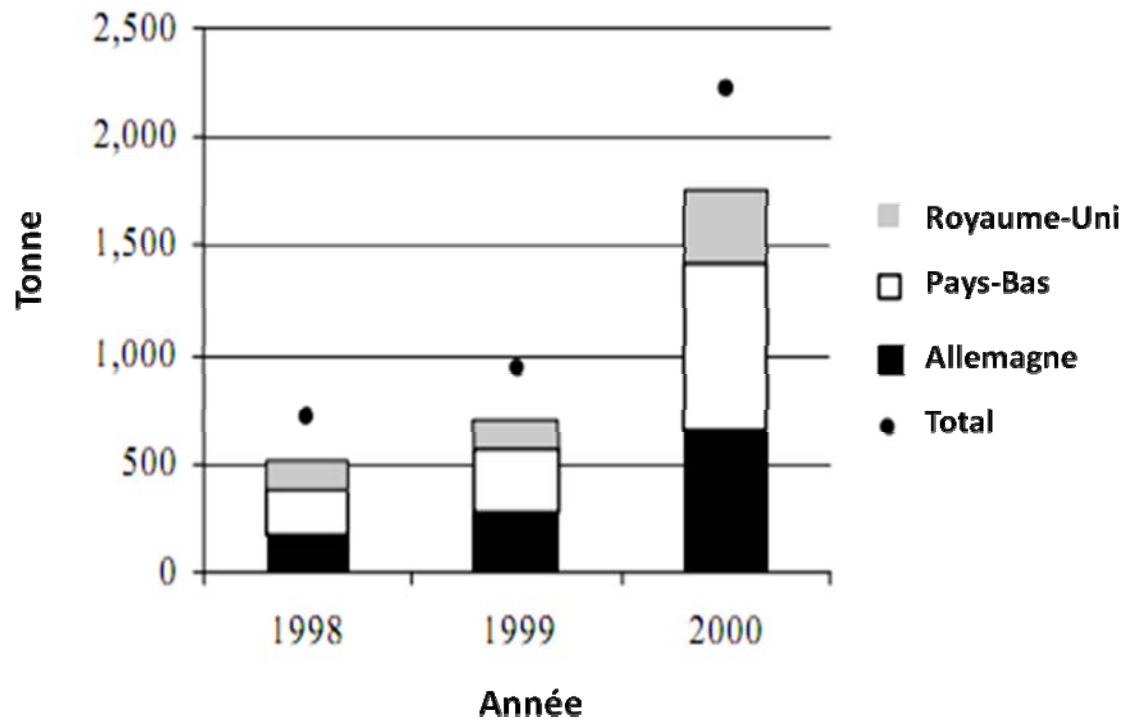


Figure I.3 : Destination des exportations de Physalis de la Colombie vers l'UE
(Source: Colombian Banco de Datos, 2000)

Le principal importateur est Les Pays-Bas, et de là les fruits sont distribués à d'autres marchés nord-européens. Bien que les données montrent une forte croissance des exportations vers l'Europe, au cours des trois dernières années, les importateurs des Pays-Bas et l'Allemagne rapportent un marché relativement stable. Les importations suisses en provenance de Colombie sont en croissance constante et ont atteint 56 tonnes en 2000. Les importations directes sont probablement complétées par des livraisons d'autres importateurs de l'UE, mais les besoins en importation annuelle totale sont encore faibles.

Les prix du marché de gros sont enregistrés et publiés, par exemple par le Centre du commerce international (www.intracen.org), et ils sont utiles pour surveiller l'activité en cours. Toutefois, les prix du marché de gros donnent un aperçu de l'activité sur une journée, sans enregistrer les volumes échangés: une pénurie temporaire ou excédentaire peut avoir un impact significatif sur les prix.

La figure I.4 montre la valeur unitaire des exportations de Physalis au cours des trois dernières années. Ces valeurs sont calculées à partir des déclarations en douane en poids et en valeur.

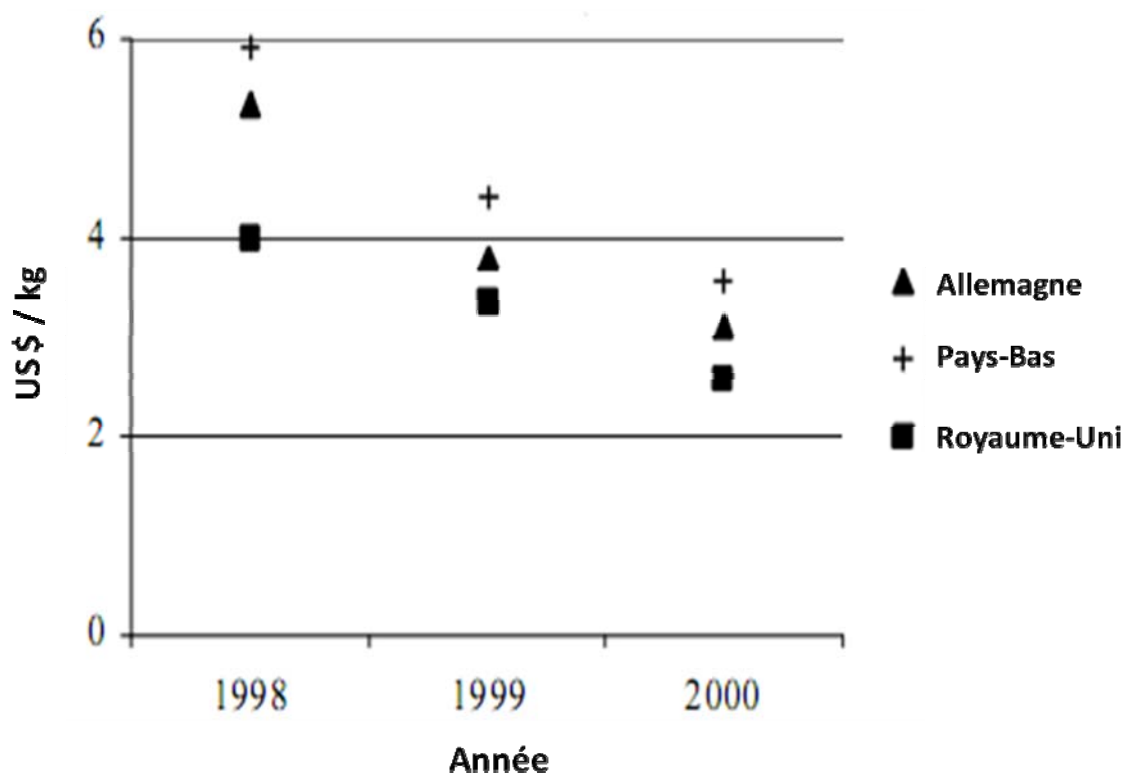


Figure I.4 : Unité de Valeur d'exportation de Physalis de la Colombie
(Source: Colombian Banco de Datos, 2000)

La baisse des prix des Physalis est liée à l'augmentation des importations sur le marché européen. Néanmoins, le prix du fruit reste élevé à plus de 2 \$/ kg FOB en 2000. Actuellement, le prix de vente en gros est en hausse à 6.8 \$ /kg (Tableau I.4).

Tableau I.4 : Prix moyen des importations par kilo
(MNS Fruits et Légumes Européens Rapport « ITC », 2000)

Destination	Fournisseur	
	Colombie	Kenya
	USD/kg	
Suisse	7.61	6.8
Belgique	6.84	
Danemark	10.76	
Finlande	9.35	
France	7.68	
Allemagne	6.73	
Pays-Bas	7.13	
Suède	7.10	
Royaume-Uni	8.33	

I.4. Le Karité (Or des Femmes)

I.4.1. Description

Le karité est un produit spécifique au continent africain qui jalonne la vie des individus depuis des temps immémoriaux. C'est un arbre considéré comme sacré et à ce titre, les autochtones ne conçoivent ni de le couper, ni de le détruire de quelque manière que ce soit. Le continent africain est aujourd'hui l'unique fournisseur mondial de ce produit avec seize pays producteurs. Traditionnellement exploité pour servir de graisse de cuisson, de savon ou de source d'énergie, le beurre de karité alimente aujourd'hui d'autres filières aussi différentes que la chocolaterie ou la cosmétologie/pharmacologie (UNCTAD, 2006). Le bois de karité peut être également exploité comme bois rare dans des meubles et objets artisanaux.

I.4.2. Les caractéristiques techniques

I.4.2.1. L'arbre de karité

Le karité *Vitellaria paradoxa* anciennement appelé *Butyrospermum paradoxum* est un arbre de la famille des sapotacées qui pousse à l'état sauvage en Afrique de l'Ouest à l'intérieur d'une zone géographique qui s'étend du Mali au Soudan au nord et du Togo à l'Ouganda au sud. Celle-ci est surnommée par les négociants "la ceinture du karité". L'arbre peut mesurer entre dix et quinze mètres de hauteur et possède un fût court (trois mètres environ) d'un diamètre pouvant aller jusqu'à un mètre (Figure I.5). Sa durée de vie est estimée à deux ou trois cents ans. Son système racinaire étant très tortueux, il prévient l'érosion et favorise l'association avec d'autres cultures. Le karité n'a encore jamais fait l'objet d'une culture organisée à proprement dit du fait notamment du nombre d'années qui lui sont nécessaires avant de produire le moindre fruit (en général une quinzaine). En sachant que la pleine maturité de l'arbre et donc la production maximale n'est atteinte qu'à compter de sa vingt-cinquième année environ (UNCTAD, 2006).

I.4.2.2. Les fruits du karité

Le fruit du karité appelé également karité se présente sous la forme de grappes de fruits ovoïdes de couleur vert sombre à brun dont la taille est généralement comprise entre quatre et huit centimètres de long (Figure I.5). Une fois ouvert, le fruit contient une, voire deux amandes dures, d'une teinte blanchâtre entourée(s) d'une coque mince et de pulpe (55%). Chaque amande recèle une

matière grasse pour environ la moitié de son poids. Les fruits sont ramassés entre juin et septembre. C'est une tâche généralement réservée aux femmes, c'est pourquoi on lui attribue volontiers le qualificatif "*d'or des femmes*". La composition d'une amande de karité se fait en général selon les proportions moyennes rappelées dans le tableau ci-dessous. Toutefois, ces proportions sont susceptibles de varier selon notamment l'origine du produit, la sous-espèce (*Vitellaria paradoxa* ou *Vitellaria nilotica*) et surtout la manière dont il est traité (El Sheikha, 2009b).



Figure 1.5 : L'arbre et le fruit du Karité *Vitellaria paradoxa*
(Source: El Sheikha, 2009b).

1.4.3. Origine et histoire

Le karité est un produit traditionnellement et exclusivement africain. Les premières traces écrites que l'on trouve au sujet de ce produit ont été rapportées par l'explorateur écossais Mungo Park (1771-1806) qui fut le premier à donner les caractéristiques botaniques de cet arbre, ainsi qu'à énumérer les principales applications du beurre de karité dans son ouvrage de 1797 intitulé: "Travels in the Interior Districts of Africa". Dans ce document, Park décrit un produit transporté sur la côte de Gambie : le "shea-toulou" qui signifie littéralement: "beurre d'arbre" ou "beurre végétal". Il explique qu'en tout lieu, la population est impliquée dans la cueillette des fruits et dans la préparation du beurre obtenu par cuisson de l'amande dans l'eau bouillante. Ce mode de fabrication traditionnelle est toujours utilisé de nos jours. En Egypte, où l'on a également retrouvé des traces de karité, on pense que l'arbre servait à fabriquer des statues, environ trois siècles avant notre ère (UNCTAD, 2006).

I.4.4. Culture

I.4.4.1. Les conditions de culture

Le karité est un arbre qui pousse exclusivement en Afrique dans les savanes arborées de la région sahélienne. Il n'a jamais pu faire l'objet d'une culture organisée à ce jour. Pour bien se développer, il a besoin de certaines conditions écologiques. Parmi celles-ci, on peut citer notamment une pluviométrie importante (1000 mm/an). C'est un facteur déterminant pour le niveau de rendement. L'existence de deux saisons, une sèche et une humide, bien distinctes au long de l'année constitue une condition nécessaire à sa croissance. Le karité est un arbre qui s'acclimate assez bien aux sols pauvres et aux environnements secs.

Il existe en fait deux variétés principales de karité. La première *Vitellaria paradoxa* pousse principalement en Afrique de l'Ouest, alors que la seconde : *Vitellaria nilotica* est essentiellement produite dans le nord de l'Ouganda et dans le sud du Soudan. Le karité demande un certain temps avant de commencer à produire. Les premiers fruits apparaissent lors de la quinzième année, mais la pleine maturité de l'arbre n'est atteinte qu'à partir de la vingt-cinquième année. Une fois cette date passée, l'arbre peut produire pendant près de deux siècles.

Une campagne commence par l'éclosion des fleurs, entre les mois de décembre et de mars. Ces fleurs sont de couleur brune et dégagent un parfum prononcé. Cinq mois plus tard apparaissent les premiers fruits. La récolte se fera pendant la période des pluies, entre les mois de juin et de septembre. Cette tâche est un travail essentiellement féminin qui demande beaucoup de rapidité, ainsi qu'une grande attention afin de ne pas risquer d'endommager les fruits (un terme plus approprié que celui de récolte serait d'ailleurs ramassage). En effet seuls les fruits tombés au sol sont recueillis car ils ont atteint leur pleine maturité et donneront, par conséquent, un taux plus élevé en graisse. Ce sont les femmes également qui préparent le beurre de karité à partir des noix ramassées. Elles les concassent, puis les cuisent dans l'eau bouillante et finalement les malaxent et les façonnent sous forme de boules (UNCTAD, 2006).

I.4.4.2. Les rendements

Traditionnellement, on estime qu'un arbre à karité donne entre douze et quinze kilos de noix sèches par an. Une fois traitées de manière artisanale ou industrielle, les amandes fournissent entre trois et quatre kilos de matières grasses

qui donneront après traitement entre un et deux kilos de beurre de karité. Cependant ces chiffres sont sujets à de très fortes variations suivant le lieu et l'année de production.

Actuellement, la production du karité est un marché de niche, notamment du fait de l'absence de culture à proprement parler. Toutefois, cela pourrait changer à l'avenir notamment sous l'effet :

- 1) de la Directive européenne "cacao et chocolat" adoptée le 3 août 2000 et qui autorise le recours à 5% de matières grasses végétales autres que le beurre de cacao,
- 2) de la recherche menée par quelques pays et organismes internationaux aussi bien publics que privés quant à la possibilité de développer la culture du karité.

Depuis 1961, le rendement mondial de noix de karité est resté stable avec une moyenne de 1,9 t/ha. Une étude plus poussée au niveau des pays producteurs permet de constater que près de 60% de la production mondiale est fournie par un seul pays, le Nigeria. Il s'agit pourtant du pays au rendement à l'hectare le plus faible mais il bénéficie de l'importance de la superficie des terres cultivées. En ce qui concerne les autres pays producteurs, leur rendement est plus important, en moyenne entre 2,5 t/ha. Cette productivité a connu une réelle stabilité durant ces quarante dernières années, sauf en ce qui concerne la Côte d'Ivoire. En effet, même si cette dernière annonce un taux de rendement moyen équivalent: 2,41 t/ha sur quarante ans, elle affiche de grandes fluctuations, en particulier depuis le milieu des années 1980, passant ainsi de 2,53 t/ha en 1985 à 2,02 t/ha en 1992, puis 4,03 t/ha en 1995 et finalement 2,18 t/ha en 2005 (UNCTAD, 2006).

1.4.5. Qualité

1.4.5.1. Critères de qualité au niveau mondial

Etant donné la petite taille du marché du karité et surtout son faible degré d'organisation, aucune norme n'a encore été définie à son sujet au niveau international. Par contre, une réglementation existe pour le chocolat et pour les ingrédients autorisés dans sa composition (Règlement CE 36/2000). En effet, 5% de graisse non issue du beurre de cacao sont maintenant autorisés dans la fabrication du chocolat et le beurre de karité qui possède une plage de fusion proche de celle du

cacao, subit une demande importante qui pourrait avoir une influence sur ce secteur à court terme.

1.4.5.2. Critères de qualité minimaux à l'importation

D'après une étude de mai 1999, menée par la société Fintrac Inc. Intitulée "market and technical survey : Shea nuts", il semblerait que des précisions soient apportées quant à la composition des noix de karité lors de leur importation. D'après cette enquête, la référence en la matière serait la suivante (en % par livre):

- Acides gras libres (FFA) = 6%
- Teneur en humidité = 7%
- Teneur en huile = 45%
- Teneur en latex = 4% à 10%

La teneur en huile est l'élément qui prévaut dans l'analyse de la noix de karité du fait de son influence lors de la fabrication de beurre qui entre lui-même dans la production des "équivalents beurre de cacao (CBE)" pour le chocolat. Si l'analyse montre une teneur en huile plus élevée, ainsi qu'un niveau plus faible d'eau et d'acides gras libres, l'exportateur recevra une prime pour son karité. Les acheteurs de beurre de karité peuvent également recommander un certain indice d'iode directement relié à la saturation du beurre ainsi qu'une plage de fusion plus faible. Il est important que le produit soit, dans la mesure du possible, exempt de corps étrangers. Dans l'industrie des cosmétiques et de la pharmacologie, le produit doit avoir subi un niveau de raffinage très poussé impliquant un cahier des charges détaillé présentant les différents niveaux d'acides gras, d'indice de réfraction ainsi que d'indice de saponification.

1.4.6. Les secteurs d'utilisation

Dans les pays où il est produit, le karité sert principalement de graisse de cuisson pour les aliments. Dans deux des principaux pays producteurs: le Mali et le Burkina Faso, le karité est la première source de graisses alimentaires pour les populations rurales. Toutefois, il est également employé dans d'autres domaines tels que ceux de l'hygiène corporelle (fabrication de savons) ou de la cosmétique (pour le corps, le visage et les cheveux).

Les principaux débouchés des produits du karité à l'exportation sont la filière chocolatière, l'industrie de la cosmétique ainsi que de la pharmacologie (UNCTAD, 2006).

1.4.6.1. Le débouché chocolatier

Sachant que le beurre de cacao représente le cinquième du poids du chocolat et environ 10% de son coût de revient, un effet de substitution de produits avec le beurre de karité dont le coût est bien moindre existe. Cette substitution était déjà autorisée dans diverses régions du monde telles que les Etats-Unis (avec un maximum de 5% de graisses végétales dans le chocolat), le Japon (entre 5% et 8%) et l'Europe orientale (jusqu'à 15%).

A l'aube du nouveau millénaire, le débouché de la chocolaterie représente environ 95% des importations mondiales de noix et de beurre de karité. Dans ce cadre, les industriels de la branche s'intéressent aux caractéristiques de ce produit et en particulier à sa vocation à dégager des oléines et des stéarines lorsqu'il est fractionné. Le beurre de karité offre aux consommateurs l'avantage de ne pas fondre à température ambiante. Il est de ce fait très employé dans les opérations de nappage ou de couverture des barres chocolatées ou des confiseries à base de cacao par exemple.

1.4.6.2. La cosmétologie et la pharmacologie

La teneur très élevée du beurre de karité en insaponifiables lui procure des propriétés particulières très recherchées dans ces deux industries. Bien que ne représentant à l'heure actuelle que 5% des importations globales, ces deux débouchés devraient se développer à l'avenir notamment sous l'effet d'un retour au naturel et aux produits ethniques. En outre, ces utilisations requièrent la conservation des qualités physiques et chimiques du karité, ce qui ne peut être obtenue que par la voie du traitement traditionnel ou semi-industriel. Ainsi les pays producteurs devraient capturer une plus grande part de la valeur ajoutée du beurre de karité. Finalement, quelques grands groupes de cosmétiques à l'instar de "The body shop" ou "l'Occitane" ont décidé de sécuriser leurs approvisionnements en concluant des accords avec des groupements de femmes productrices dans certains pays fournisseurs de karité (Figure 1.6).



Figure I.6 : Quelques produits du Karité
(Source: El Sheikha, 2009b)

1.4.7. Le marché

Le marché du karité est un marché assez étroit, hermétique et encore mal connu.

1.4.7.1. La production

La production mondiale de noix de karité est concentrée en Afrique à l'intérieur d'une bande de 5000 km s'étendant depuis l'Afrique de l'Ouest jusqu'au Soudan. Seize pays en produisent : le Bénin, le Burkina Faso, le Cameroun, la République Centrafricaine, la Côte d'Ivoire, la Gambie, le Ghana, la Guinée, le Mali, le Niger, le Nigeria, l'Ouganda, le Sénégal, le Soudan, le Tchad et le Togo. Comme la figure I.7 l'indique, la production mondiale de noix de karité a nettement progressé depuis les années 1960. Elle enregistrait un niveau de 169 000 tonnes environ en 1961 contre 693 000 en 2005. Cette augmentation du volume de production est presque exclusivement due à l'évolution des superficies plantées en karités qui étaient de 85 000 hectares en 1961, tous pays confondus, contre quatre fois plus en 2005 (avec 356 300 hectares). Le rendement quant à lui a peu évolué, il était de 1,99 t/Ha en 1961, contre 1,95 t/Ha en 2005, le rendement mondial moyen sur quarante ans étant de 1,87 t/Ha environ.

La figure I.7 donne la répartition de la production entre pays producteurs qui est assez inégale. Sur les sept pays pour lesquels des données statistiques existent, un pays, le Nigeria représentait plus de 60% de la production de noix de karité en 2005. Il est suivi du Mali, du Ghana et du Burkina-Faso qui regroupent ensemble un peu moins du tiers de la production sur l'année 2005. La part détenue par ces quatre États représente en moyenne plus de 90% de la production sur la période 1961-2005.

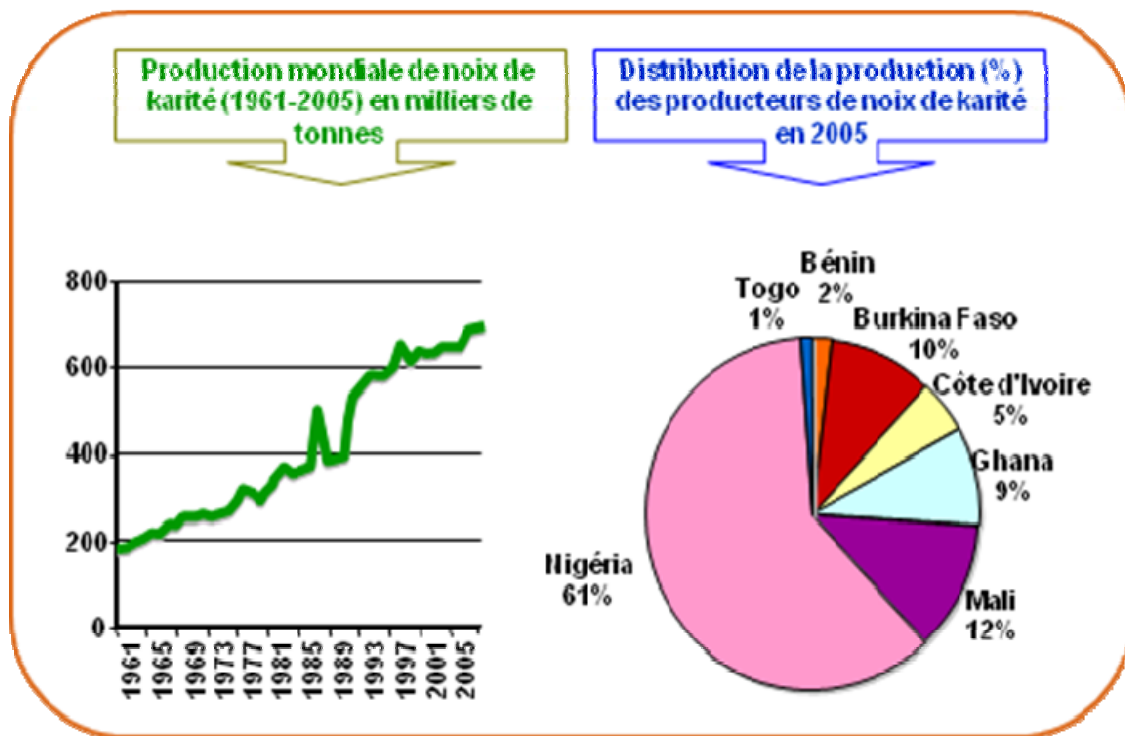


Figure 1.7 : Production mondiale de noix de Karité
(Source: Secrétariat de l'UNCTAD, 2006 et FAOSTAT, 2010)

1.4.7.2. La consommation de fruits et de beurre de karité

La majeure partie de la consommation de karité se fait à l'échelon national, local, voir au sein de la cellule familiale. Cette consommation, qualifiée d'autoconsommation, n'est pas prise en compte dans les statistiques officielles. En Afrique, le fruit du karité est souvent consommé comme fruit frais pour sa pulpe sucrée et comestible, comme remède dans la médecine traditionnelle ou comme produit de beauté par les femmes, mais il permet aussi et surtout de fabriquer le beurre de karité qui est très employé comme matière grasse pour la cuisson des aliments, principalement dans les zones rurales qui comptent pour les huit dixièmes de la consommation totale.

En dehors de l'Afrique, en Europe par exemple, la consommation annuelle de beurre de karité fluctue généralement entre 40 000 tonnes et 60 000 tonnes principalement utilisées (95%) par l'industrie du chocolat. D'après certaines sources de l'industrie, les quantités exportées vers le Japon, les Etats-Unis ou la Suisse seraient principalement destinées à un usage cosmétique ou pharmacologique (El Sheikha, 2009).

1.4.7.3. Le commerce international

Concernant les exportations, les données statistiques ci-dessous confirment l'importance de leur variation d'une année sur l'autre. L'exemple de la noix et du beurre de karité durant la décennie 1980 est particulièrement représentatif de cette tendance (Tableau I.5).

Tableau I.5 : Exportations mondiales de noix et de beurre de karité durant la décennie 1980 (Secrétariat de l'UNCTAD, 2006 et FAOSTAT, 2010)

	Beurre de karité	Noix de karité
	<i>(en tonnes)</i>	
1981	52	65 352
1982	2 239	40 768
1983	2 753	64 428
1984	7 619	65 072
1985	2 865	102 192
1986	10 488	61 534
1987	279	36 855
1988	3 079	38 128
1989	641	24 344
1990	1 384	63 798

Une bonne corrélation existe entre les deux types d'exportations (noix et beurre) sur la période 1961-2004. En agrégeant les données, on trouve que le ratio beurre sur noix de karité pour les exportations de ces produits représente, sur la période, un taux de 3,5% environ.

Les statistiques nationales indiquent les éléments suivants :

- tout d'abord, le Nigeria, premier producteur mondial de noix de karité avec 61% en 2005, n'est pas présent dans le classement des principaux pays exportateurs, la production étant presque intégralement consommée localement ;
- ensuite, pour les six principaux pays exportateurs de noix de karité que sont le Bénin, le Burkina-Faso, la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Mali et le Togo, le recoupement des données statistiques entre le rapport Comtrade (120792) et la FAO permet d'évaluer la part moyenne de ces pays dans les exportations cumulées des six pays sur la période 1961-2001 (Figure I.8).

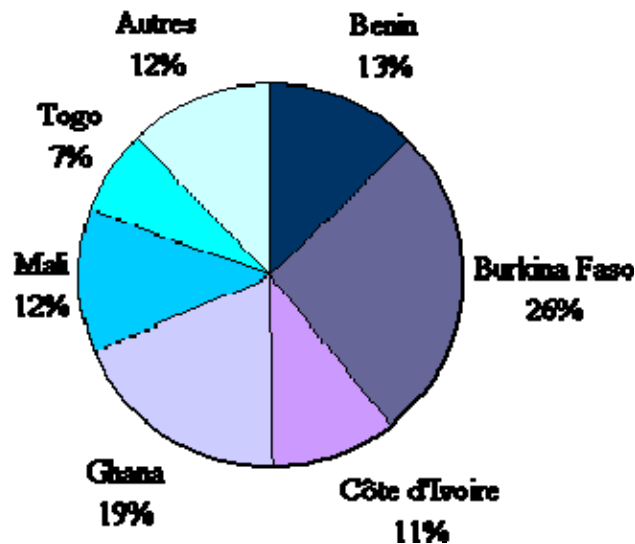


Figure I.8 : Estimation de la part moyenne des principaux pays exportateurs de noix de karité dans les exportations globales entre 1961 et 2004
(Source: Secrétariat de l'UNCTAD, 2006 et FAOSTAT, 2010)

A l'instar des exportations, les importations de noix de karité sont très irrégulières sur la période 1973-2004. Elles connaissent des périodes de creux comme avant 1975 ou en 1993 et de pics comme en 1984 ou 1996. Concernant les principaux pays importateurs, certains faits sont à relever. En effet, la Suède et le Royaume-Uni représentaient 97% des importations mondiales de noix de karité en 2001.

1.4.7.4. Le prix

Etant donné l'organisation balbutiante de la filière karité, aucun prix de référence international n'existe à ce jour. Les cours du karité peuvent donc varier d'une origine à l'autre selon les conditions de production et de commercialisation. En général, les prix moyens (depuis 1990 à ce jour) se situent aux environs de 300 US\$ la tonne CAF. Par exemple, durant la campagne 2002, le cours de la tonne d'amande originaire du Togo fut estimé à environ 266 US\$ CAF Europe. Cependant, en fonction du développement du marché et lorsque les prix du cacao augmentent fortement, les prix de la noix de karité peuvent flamber pour avoisiner les 1 000 US\$ la tonne CAF.

Certains produits reçoivent une prime de la part des acheteurs. C'est le cas par exemple des noix en provenance du Ghana ou du Nigeria qui offrent une teneur

en huile plus importante et un prix à la tonne moyen généralement compris entre 275 et 350 US\$. C'est également le cas des noix issues de la variété " *Vitellaria nilotica* " en provenance d'Ouganda ou du Soudan qui s'échangent à un prix moyen de 60 US\$ le kilo.

En ce qui concerne les prix payés à l'exportation des noix de karité, le tableau I.6 donne une estimation des prix payés par certains pays en fonction de différentes origines. Cette estimation s'appuie sur des informations extraites de la base de données UN Comtrade (code: 120792) pour les principaux pays exportateurs ayant rapporté.

Tableau I.6 : Estimation des prix payés par certains pays acheteurs pour du karité de différentes origines
(Secrétariat de l'UNCTAD et UN Comtrade «code: 120792», 2006)

	Pays acheteur	Pays exportateur	Prix payé en \$/t
1995	Suède	Ghana	328,64
		Côte d'Ivoire	313,70
1997	Suède	Togo	297,20
1999	Inde	Ghana	331,60
		Côte d'Ivoire	363,09
		Nigeria	239,92
	Indonésie	Ghana	340,47
2000	Suède	Bénin	225,00
		Ghana	202,27
	Suède	Ghana	160,20
		Guinée	311,60
2001	Royaume-Uni	Ghana	215,70
		Burkina Faso	270,20
		Bénin	188,93
		Nigeria	192,96
		Singapour	226,70
2002	Inde	Ghana	280,96

Les données estimées de ce tableau corroborent l'existence d'une prime à la qualité accordée à certains pays par certains acheteurs. C'est le cas du Ghana et de la Côte d'Ivoire au contraire du Togo entre 1995 et 1997.

D'une année sur l'autre, le prix accordé aux fournisseurs varie de manière importante. Le Ghana, par exemple, recevait près de 329 \$ la tonne en 1995 contre la moitié moins en 2001.

Selon la revue spécialisée "marchés tropicaux et méditerranéens" (dossier karité - 23/02/2001), l'année karitéière peut-être divisée en trois sous-périodes: septembre/octobre, décembre et janvier à mars (voir schéma ci-contre).

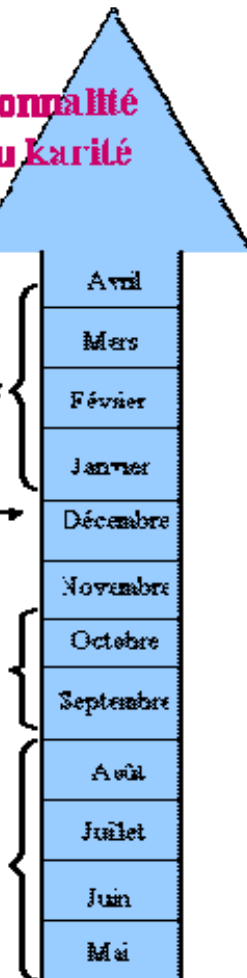
Exemple de saisonnalité pour les prix du karité

Il existe souvent un pic entre janvier et mars (ou février, env. 80FCFA à 130FCFA par kilo).

A compter de décembre, les prix commencent à se stabiliser

Les prix sont généralement au plus bas de l'année (entre 5 et 20 FCFA le kilo pour le producteur)

RECOLTE DES FRUITS



Le marché du karité étant peu organisé, il n'existe aucun contrat à terme ou d'options permettant de se couvrir contre les aléas de prix. Le niveau très faible des échanges explique en partie cette situation. En outre, les acheteurs de karité sous forme de noix, ou plus rarement sous celle de beurre, se fournissent directement auprès du producteur ou du groupe de producteurs sans l'intervention d'un intermédiaire. Une part non négligeable des entreprises européennes, américaines ou japonaises possède d'ailleurs leur propre bureau dans les pays producteurs ou travaille directement avec un groupement de productrices, comme c'est souvent le cas pour les sociétés du secteur des cosmétiques.

1.4.8. Le projet Européen Innovkar

1.4.8.1. Présentation du projet

C'est un projet de recherche, financé par l'Union Européenne. Il répond à l'appel d'offre INCO du 6ème PCRD. Innovkar signifie «Outils innovants pour

soutenir l'utilisation durable de l'arbre de karité» (U.E. projet n°032037). Toutes les informations sur **Innovkar** sont le site du projet (<http://inco-innovkar.cirad.fr/project>).

Vitellaria paradoxa est une espèce importante pour la production de matières grasses végétales comestibles et produits de soins personnels à base de l'amande séchée de ses fruits. Cette espèce montre un fort potentiel de génération de revenus et assure une part de la sécurité alimentaire dans la zone soudano-sahélienne. Afin d'obtenir une production durable en termes de quantité et de qualité et en vue de promouvoir le commerce des produits de karité, nous proposons une approche de recherche intégrée et innovante qui couple des méthodes biophysiques, biologiques, chimiques et socio-économiques.

Le projet propose d'étudier l'impact du changement climatique sur l'arbre de karité par la modélisation de la distribution des arbres en vertu des scénarios de changement climatique et d'évaluer la résilience des populations face à la sécheresse en utilisant des variables écophysiologiques. L'impact du changement global sera analysé sur la régénération naturelle et la diversité génétique et la production de fruits seront évaluées et prédites sur le long terme en élaborant des forêts modèles dynamiques. Ces deux activités permettront l'élaboration d'une stratégie de gestion des ressources pour l'utilisation durable des forêts à moyen et long terme. La valorisation des origines et des variétés paysannes sera étudiée par la caractérisation des ressources génétiques en analysant les variables chimiques pour les beurres. Leurs propriétés anti-oxydantes seront testées pour le développement du marché des soins personnels.

La traçabilité des fruits et du beurre de karité à différents stades de leur traitement, sera étudiée en utilisant deux techniques innovantes dont l'une spécialement développée pour ce projet. Ainsi, une nouvelle méthodologie basée sur la spectrométrie proche infrarouge sera testée pour comparer différentes origines géographiques et aussi pour abaisser le coût des analyses chimiques. Le projet propose également d'analyser les caractéristiques et tendances des filières karité et les rôles des acteurs du marché impliqués dans la production, la commercialisation et la consommation des produits. Le résultat sera synthétisé, traduit en recommandations opérationnelles et diffusé par le biais d'un processus participatif.

1.4.8.2. Innovkar.... pour quoi ?

Il y a eu des progrès considérables dans la connaissance scientifique et la mise en œuvre des techniques sur l'arbre de karité au cours des dix dernières années. Toutefois, il existe encore de nombreuses menaces et contraintes qui ont besoin d'une attention urgente:

(1) Menaces pour les ressources naturelles

- * Pour le Sahel ouest-africain, les vingt-cinq dernières années ont vu une baisse significative des précipitations (30% de moins que la moyenne calculée avant 1960) menaçant les parcs de karité (impact négatif sur la régénération naturelle),
- * Les populations de l'arbre de karité sont gravement menacées en raison de la mécanisation agricole qui réduit la densité des arbres de karité; En outre, il n'existe aucune information quant à la conséquence de cette situation sur la diversité des espèces et la qualité de la population dans le moyen ou long terme;

(2) Contraintes du marché

- * Les marchés non-traditionnels continuent d'évoluer rapidement, car la demande internationale de l'industrie des soins augmente, bien que le potentiel de beurre de karité soit encore mal compris et documenté, avec de très faibles niveaux de sensibilisation des consommateurs;
- * Depuis le 1^{er} Janvier 2005, la nouvelle réglementation européenne impose la traçabilité des sources de production pour tous les produits agricoles. Il y a eu quelques tentatives d'améliorer la traçabilité des produits du karité par voie administrative;
- * Le pouvoir de négociation des producteurs est limité. Une forte intégration verticale de toutes les étapes de la chaîne de valeur ajoutée au-delà Afrique de l'Ouest et de la domination de quelques joueurs en font un marché d'acheteurs avec justesse ;
- * Le manque de connaissances des producteurs et des intermédiaires vis-à-vis des règles et règlements en vigueur dans l'UE, de sorte que les acteurs africains ne sont pas prêts à façonner le marché par eux-mêmes;
- * Le manque de connaissance de la variation des paramètres de qualités les plus économiquement importants (par exemple teneur en matières grasses et profil en acides gras) limite actuellement la mise en œuvre d'un label de qualité effective du produit;

(3) Nécessité d'améliorer la qualité en production

* Les caractéristiques chimiques des amandes de karité parmi les variétés paysannes ne sont pas suffisamment connues. Tous les programmes de plantation de l'arbre ont pour objectif des gains économiques et il est donc important de déterminer si cette variation va toucher l'environnement (édaphique ou climatique) la modification ou la différenciation génétique entre les populations.

* L'impact des variations climatiques et de la mécanisation de l'agriculture sur la production de karité doit être évalué.

* Un contrôle de la qualité doit être mis en place.

(4) Nécessité de développer de nouveaux produits

Bien que la demande en matières grasses comestibles soit très importante, le marché non traditionnel du beurre de karité pour les produits de soins personnels est de plus en plus remarquable et représente le plus fort potentiel de valeur ajoutée à la source. Le potentiel de l'espèce et en particulier la variation en fonction de l'arbre et l'origine ne sont pas encore bien connus. Pour obtenir des résultats de recherche significatifs aux niveaux nationaux, régionaux et avoir un impact international, le Sénégal, le Mali, le Ghana, le Burkina Faso et l'Ouganda, se sont fortement impliqués dans la production et la gestion durable de l'arbre de karité et ont décidé d'élaborer un projet intégré. D'autres programmes de recherche antérieurs sur l'arbre de karité ont déjà permis de travailler sur les profondes préoccupations de ces pays vis à vis de nombreuses contraintes citées plus hauts.

En collaboration avec 5 partenaires européens, basés sur l'état de l'art et l'analyse des contraintes, ils ont décidé de définir les priorités de recherche en accord avec les mesures spécifiques de l'appel d'offre INCO. La sélection des thèmes de recherche ont été guidés par :

* La création d'outils et techniques innovants pour la caractérisation, le développement et l'utilisation des espèces avec une tolérance accrue à la sécheresse et à la chaleur,

* Le développement et la diffusion de la gestion durable des ressources génétiques en tenant compte des connaissances traditionnelles et des méthodes innovantes, et

* Le développement de solutions novatrices, efficaces en post-récolte, de stockage, de transformation et de commercialisation, respectueuses de l'environnement.

I.5. Micro-organismes, origine et communauté microbienne

I.5.1. Micro-organismes

Pour simplifier, la notion de micro-organismes sera ici limitée aux bactéries, levures, moisissures et algues classées en deux groupes, procaryotes et eucaryotes, l'ensemble correspondant grosso modo aux protistes ([Whittaker, 1969](#)).

Eucaryotes ou protistes supérieurs : algues, protozoaires et champignons. Cellule avec un «vrai» noyau entouré d'une enveloppe nucléaire qui contient deux jeux semblables de chromosomes (cellule diploïde).

Procaryotes ou protistes inférieurs : algues bleu-vert ou cyanophycés et bactéries. Cellule dépourvue d'un véritable noyau à tous les stades de son développement, un seul chromosome porteur de la grande majorité de l'information génétique (cellule haploïde).

I.5.2. Origine de la flore microbienne des aliments

L'origine des microorganismes qu'on retrouve dans les aliments dépend d'une part, de l'environnement, de la production, de la matière première (sol, air, eau) et d'autre part, des conditions de sa manipulation (récolte ou capture, transport, etc.) et de sa transformation (machines, personnel, traitements de stabilisation, etc.) en produit fini (Guiraud, 2003).

On peut distinguer la flore normale, rencontrée chez les sujets sains (flore commensale) et la flore pathogène rencontrée chez les sujets malades. Les flores commensales des animaux et des végétaux sont de type sensiblement différent. Cependant, la flore de surface peut présenter des similitudes car elle provient de contaminants de l'environnement : air, eau, sol, etc. La flore pathogène est totalement différente : la flore végétale a un métabolisme plutôt orienté vers les glucides, alors que celle des animaux l'est vers les protéines.

I.5.2.1. Flore issue des fruits et légumes

La flore originelle est constituée par une flore saprophyte très abondante en relation étroite avec l'environnement (air, sol, eau) et éventuellement par une flore phytopathogène (Guiraud, 2003).

Les fruits et légumes ont une flore microbienne riche en levures (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, etc.) et en moisissures (*Saprolegnia*, *Pasmidiophora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc.). Les

bactéries qu'ils contiennent appartiennent essentiellement au groupe des bacillus Gram – (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, etc.) et à celui des bacilles Gram + asporulés (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, etc.).

1.5.3. Notions générales de communauté microbienne et facteurs d'influence de la croissance

1.5.3.1. Introduction à la communauté microbienne

La croissance, la multiplication et la mort des micro-organismes sont influencées par un grand nombre de conditions environnementales favorables ou défavorables à leur développement (Atlas, 1988). Quel que soit l'environnement naturel considéré (on parle également de biotope), une espèce microbienne n'est jamais seule. Bien au contraire, elle doit cohabiter ou disparaître face à la «concurrence» d'autres espèces microbiennes de caractéristiques métabolites, physiologiques et nutritionnelles qui peuvent être parfaitement identiques, similaires ou complètement différentes. L'ensemble des micro-organismes présents dans un écosystème donné est appelé communauté. La communauté est donc un assemblage de populations microbiennes qui coexistent et interagissent les unes avec les autres dans un même habitat (cohabitation). Un écosystème est un système autonome incluant les micro-organismes d'une communauté et l'environnement physico-chimique de cette communauté (Atlas, 1988; Alexandre, 1997). Chaque population de la communauté occupe un «espace fonctionnel», également appelé niche écologique au sein de la communauté. Cette notion de niche fonctionnelle est également liée à la notion de micro-habitats qui correspondent à des sous-systèmes bio-physico-chimiques particulier au sein de l'écosystème ou biotope.

D'une grande diversité métabolique, les espèces microbiennes ne se développent pas toutes dans les mêmes conditions. Chaque espèce, voire chaque souche microbienne, a ses propres tolérances pour chaque paramètre environnemental spécifique en fonction de ses capacités physiologiques et génétiques (Atlas, 1988).

1.5.3.2. Facteurs environnementaux

Le tableau 1.7 donne les conditions physico-chimiques de croissance des micro-organismes dépendant de l'environnement (température, pression, etc.).

Tableau I.7 : Facteurs physico-chimiques de la croissance des micro-organismes
(Association RECORD, 2002)

Facteurs	Rôle
Température	<ul style="list-style-type: none">▪ Organismes psychrophiles: temp. Optimale < 1°C▪ Psychrotrophes: temp. optimale entre 5 et 15°C▪ Mésophiles: temp. optimal entre 20 et 40°C▪ Thermophiles : temp. Optimale > 50°C
pH	<ul style="list-style-type: none">▪ pH optimal compris entre 3 et 6 pour les champignons▪ Neutralité pour la plupart des bactéries. Cependant certaines bactéries sont acidophiles (<i>Thiobacillus thiooxidans</i> avec optimum de croissance à pH= 2) ou basophiles (certains <i>Vibrio</i>)
Oxygène	<ul style="list-style-type: none">▪ Aérobie ou Anaérobie (stricte ou facultative)
Salinité	<ul style="list-style-type: none">▪ Détermine la pression osmotique▪ Micro-organismes halophiles qui se développent dans les saumures

Certaines conditions environnementales (paramètres physico-chimiques) influencent la croissance des micro-organismes. Parmi celles-ci figurent le pH (acidité et alcalinité), la température, la présence d'O₂, de CO₂ et la disponibilité de l'eau.

Bactéries : Les bactéries peuvent être distinguées par leur aptitude à croître en fonction de la température. Les mésophiles se développent généralement à des températures comprises entre 20 et 45°C. Les psychrophiles possèdent des températures optimales de croissance inférieures à 15°C, alors que les bactéries thermophiles croissent de façon optimale à des températures comprises entre 45 et 70°C. Les micro-organismes ayant des températures optimales de croissance supérieures à 70°C sont qualifiés d'hyperthermophiles.

De même, la plupart des micro-organismes tolèrent une gamme de pH permettant la croissance. Le pH optimal de croissance de beaucoup de bactéries est proche de la neutralité (pH 7). Les micro-organismes acidophiles se développent à des pH acides, alors que les micro-organismes alcalinophiles se développent à des pH basiques.

Selon leur mode de vie, les bactéries peuvent être classées en différents groupes :

- Les aérobies stricts peuvent vivre uniquement en présence de dioxygène ou oxygène moléculaire (O₂).

- Les aéro-anaérobies facultatives peuvent vivre en présence ou en absence de dioxygène.
- Les anaérobies ne peuvent vivre qu'en absence de dioxygène. Les aérotolérants sont des organismes anaérobies qui peuvent tout de même survivre en présence d'oxygène.
- les microaérophiles requièrent de l'oxygène pour survivre mais à une concentration faible.

Les bactéries exigent un certain seuil d'humidité et pour des A_w faibles, leur croissance est ralentie. Certains germes ne se développent que pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,97. C'est le cas des *Acinetobacter* spp. ($A_w > 0,99$) ou de *Clostridium botulinum* ($A_w > 0,97$). Les *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli* commencent à se multiplier pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,95. *Staphylococcus aureus* se multiplie à partir de 0,85 mais la production éventuelle de toxines n'est possible que pour des valeurs supérieures à 0,97. *Listeria monocytogenes* peut supporter une A_w de 0,83 et les bactéries halophiles une valeur de 0,75. Les endospores peuvent survivre dans un environnement dépourvu d'eau libre.

Les bactéries, à l'exception des Mycoplasmatales, sont peu sensibles aux variations de pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. Toutefois, certaines espèces marines sont adaptées à des milieux contenant environ 35 g de NaCl par litre. Selon leur sensibilité à la pression osmotique, on distingue trois groupes de bactéries :

- Les bactéries non-halophiles capables de croître dans des milieux dont la concentration en NaCl est inférieure à 0,2 M.
- Les espèces halophiles ne pouvant croître que dans des milieux contenant des concentrations en NaCl supérieures à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetia marina*) à 5,2 M pour les plus halophiles (*Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum sodomense*).
- Les espèces halotolérantes comme les *Staphylococcus* spp. les *Listeria* spp. ou les *Lactobacillus* spp.

Levures: Les levures sont des micro-organismes hétérotrophes, qui selon les espèces, ont un métabolisme exclusivement oxydatif ou bien un métabolisme mixte, oxydatif et fermentaire (Guiraud, 2003). Elles sont aérobies et celles qui possèdent un métabolisme fermentaire ne peuvent se développer en anaérobiose stricte qu'en présence d'ergostérol et d'acide oléique (Tween 80). Elles sont en général acidophiles et mésophiles, se multipliant à des pH compris entre 3 et 7,5 et à des températures optimales voisines de 25 à 28°C. Cependant, il existe des souches psychrophiles, des souches acidophiles (se développant jusqu'à pH 1,5) et des souches osmophiles (*Zygosaccharomyces baillii*).

Moisissures: Les moisissures sont hétérotrophes : certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques et contaminant les produits alimentaires. Les moisissures sont aérobies, en général acidophiles (pH de développement compris entre 3 et 7) et mésophiles (température optimale 20-30°C); cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température (< 15°C ou même parfois < 0°C) (*Cladosporium herbarum*, *Thamnidium elegans*). Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres micro-organismes et elles peuvent se développer sur des aliments à faible *Aw* (jusqu'à 0,65): certaines espèces sont osmophiles, halophiles ou xérophiles (Guiraud, 2003).

1.5.4. Est-ce qu'il existe une relation entre les communautés microbiennes et les origines géographiques ?

C'est l'hypothèse principale de notre étude et nous allons essayer de présenter une réponse convaincante pour expliquer la nature de la relation entre les communautés microbiennes et l'origine géographique sachant qu'il n'existe que peu d'études dans ce domaine.

Parmi ces études qui prouvent que les communautés microbiennes peuvent être des marqueurs de l'origine géographique, Maukonen et Saarela (2009) ont démontré que la diversité des communautés microbiennes d'échantillons de denrées alimentaires est due aux différents environnements naturels ou industriels. Juck *et al.* (2000) ont montré l'importance de la relation entre différentes origines géographiques d'échantillons de sol et la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes.

Pour le fromage de marque Fontina, en l'absence de culture de démarrage ajoutée, Beresford *et al.* (2001) ont montré que la flore lactique présente dans le lait cru est strictement liée à l'origine géographique de la production. Dans d'autres études, Mauriello *et al.* (2003) et Ercolini *et al.* (2008) confirment que le microbiote des fromages PDO a un lien étroit avec l'origine géographique.

Dans le même contexte, Bonetta *et al.* (2008) attribue la diversité de la flore bactérienne du fromage Rbiola di Roccaverano à sa fabrication et aux conditions climatiques différentes. En outre, Dolci *et al.* (2010) ont noté que la diversité du microbiote du fromage PDO Castelmagno est due aux conditions de fabrication et à la saison de production.

Le travail de Leasing (2005) a montré qu'il est possible de différencier les poissons venant d'origines différentes (France et Thaïlande) par l'étude de la diversité des communautés bactériennes des poissons.

Le Nguyen (2008) a travaillé sur la détermination de l'origine des différentes espèces des poissons (poisson-chat, Bar, Tilapia). Les poissons sont prélevés dans des pays différents (Vietnam, Cambodge et France). Ce travail a montré que les populations bactériennes des différentes fermes étaient différentes et spécifiques pour chaque site.

El Sheikha *et al.* (2009a) ; El Sheikha et Montet (2010) ; El Sheikha et Montet (2010) ; El Sheikha (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010a,b,c) ont travaillé sur la détermination de l'origine géographique des fruits (Physalis, Karité). Les fruits proviennent de pays différents (Égypte, Colombie, Ouganda, Sénégal, Mali, Ghana et Cameroun). Ces travaux sont le sujet de plusieurs des chapitres de cette thèse. Ils ont montré que la PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) peut ainsi être proposée comme un outil d'analyse rapide de l'origine géographique des fruits. Cette méthode permet d'obtenir un « code-barre biologique » unique pour chaque district. L'idée était de créer un «code barre biologique» (Montet *et al.*, 2004) basée sur l'analyse des ADN des micro-organismes présents sur les produits de façon globale. Cette méthode est basée sur l'hypothèse que les communautés microbiennes des fruits sont spécifiques à une zone géographique (Montet *et al.*, 2008 ; Montet *et al.*, 2010 ; Montet et El Sheikha, 2010).

Par contre, nous avons trouvé une seule publication de Maila *et al.* (2006) qui ne confirme pas le lien entre l'origine géographique d'échantillons de sol et les

communautés bactériennes. Cela peut s'expliquer par le fait que l'étude a porté sur des sols contaminés par des hydrocarbures, ce qui peut influencer fortement sur les souches microbiennes qui s'adaptent à cet environnement particulier.

I.6. La traçabilité

I.6.1. Définition

La traçabilité est l'information permettant le suivi (éventuellement rétrospectif) d'un matériau ou produit sur toute sa chaîne de production et de distribution, jusqu'à sa fin de vie « *de la fourche à la fourchette* » pour un produit alimentaire. Ce concept est devenu au 1^{er} janvier 2005 l'article 18 de la loi européenne 178/2002. Plusieurs définitions ont été données à la traçabilité dont voici les plus importantes.

La traçabilité est définie par l'Organisation internationale de normalisation (ISO 9000-2007) comme « *l'aptitude à retrouver l'historique, la mise en œuvre ou l'emplacement de ce qui est examiné. Dans le cas d'un produit, elle peut être liée à l'origine des matériaux et composants, l'historique de la réalisation, la distribution et l'emplacement du produit après livraison* ».

La traçabilité est un instrument de sécurisation des aliments et aussi un outil de gestion et de rationalisation de la chaîne de valeur alimentaire. La traçabilité ne s'applique pas toujours globalement. Il peut y avoir différents modes d'utilisation de la traçabilité. Selon que l'on s'intéresse à l'origine ou à la destination des produits, on parle de traçabilité ascendante ou descendante (Green et Hy, 2002).

La traçabilité ascendante « *tracing* » est la capacité, en tout point de la chaîne d'approvisionnement, à retrouver l'historique, l'origine et les caractéristiques d'un produit à partir d'un ou plusieurs critères donnés. Elle sert notamment à trouver la cause d'un problème de qualité, à contrôler l'exactitude des caractéristiques d'un produit (agriculture biologique, raisonnée, ...) ou de l'itinéraire du produit.

La traçabilité descendante ou avale « *tracking* » est la capacité, en tout point de la chaîne d'approvisionnement, à retrouver la localisation de produits à partir d'un ou plusieurs critères donnés. Elle sert notamment en cas de retrait ou de rappel de produits s'ils ont un effet nuisible pour la santé publique (GS1 Belgium et Luxembourg, 2006).

I.6.2. Enjeux

- ◆ Cette notion a une importance particulière et grandissante pour les produits concernant la santé humaine, comme l'alimentation et les médicaments ou bien la sécurité (aéronautique, automobile, informatique par exemple).
- ◆ Elle est utilisée aussi dans le suivi du traitement des déchets, puisqu'un producteur de déchets en est responsable jusqu'à son élimination ; elle peut alors aussi concerner les composants et sous-composants d'un objet.
- ◆ C'est aussi une préoccupation croissante pour le consommateur-citoyen, qui veut par exemple être sûr que le produit ne fait pas intervenir d'éléments contraires à son éthique ou à sa morale, comme par exemple le travail des enfants, la destruction de ressources non renouvelables, une pollution non traitée, etc. C'est un des éléments essentiel de l'écocertification et de l'écosociocertification (du bois et produits dérivés du bois par exemple).

I.6.3. Histoire

La traçabilité des actes est attestée depuis l'antiquité, par les sceaux notamment.

La traçabilité des animaux est également connue des éleveurs, propriétaires d'animaux et des autorités sanitaires depuis des milliers d'années. Ainsi l'identification par marques corporelles était déjà réglementée par le Code d'Hammurabi en Mésopotamie, il y a 3 800 ans.

Le marquage indélébile au fer rouge, ou par des marques sur les oreilles (le bec d'oiseaux parfois), avec ou sans écrits attestant les caractéristiques de l'animal, semble avoir été pratiqué presque partout dans l'antiquité, au moins pour les animaux de valeur marchande, religieuse (cf sacrifices), symbolique ou militaire.

Les cygnes des rois d'Angleterre dès le XIII^e siècle étaient marqués par des incisions sur la peau du bec.

Un marquage sanitaire accompagnant des certificats était utilisé pour contrer ou limiter les épizooties (peste bovine, peste humaine du XIV^e siècle, péripneumonie contagieuse bovine, morve, rage...), avec de sévères sanctions en cas d'infractions. Il concernait par exemple des animaux vivants, malades, douteux, morts, ou des sous-produits suspects. Jean Blancou dans « *Histoire de la traçabilité des animaux et des produits d'origine animale* » (Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 20) (OIE, 2010) cite le marquage lors d'épizooties du XVIII^e siècle, de produits contaminés ou à risques

(viandes, cuirs) découpés, lacérés ou couverts de chaux pour les reconnaître et les rendre inconsommables ou invendables.

En France, un arrêt du Conseil du roi, du 16 juillet 1784 imposait le marquage des animaux « *soupçonnés de la morve ou de toute autre maladie contagieuse telle que le charbon, la gale, la clavelée, le farcin (morve cutanée) et la rage* ». L'animal douteux ou malade devait porter un cachet de cire verte sur le front, portant les mots « *animal suspect* ». Ces animaux étant conduits et enfermés à part des autres (Reynal, 1873).

En 1875, Hurtrel d'Arboval préfère lui le plombage, en tous cas chez les bêtes à cornes, pour lesquelles on passe une ficelle reliant la base des cornes, les deux bouts sertis dans un plomb du type plomb de douane, « *cette marque s'enlève dès qu'elle est devenue inutile, et cependant elle ne peut être changée sans que cette action laisse des traces sensibles* » (Hurtrel d'Arboval, 1875).

1.6.3.1. Au XXe siècle

La traçabilité s'est d'abord développée pour répondre au modèle fordiste de production de masse, et en particulier des besoins industriels et agro-industriels de standardisation et de normalisation exacerbés par les besoins de reconstruction de l'après-guerre et la mondialisation.

Elle inspire des systèmes mondialisés de normalisation (ex : systèmes ISO). Elle passe par la généralisation de la notion de numéro de série (ensuite déclinée en code barre ou dispositifs similaires, éventuellement invisibles, tels que codes magnétiques, ou puces électronique (transpondeur) incluses dans le bois, dans un produit ou un animal vivant), car l'arrivée de la fabrication en série de produits, s'est accompagnée de la possibilité de fraudes à grande échelle ou de produire des erreurs en série. Les lots de production furent donc assortis de numéro identifiant le lot, voire le produit dans le lot, pour permettre de retrouver l'origine de séries de produits défectueux, et de retrouver ces produits eux-mêmes, par exemple pour les retirer de la vente.

La traçabilité s'est mise au service de la démarche qualité, de la lutte contre la fraude internationale, et évolue maintenant vers un suivi individualisé des produits divers. Ces produits peuvent être connus ou non (ex : contenu d'un colis postal envoyé en recommandé, suivi grâce à son identifiant). Le cheminement est suivi (quel opérateur a manipulé quel produit et où, avec quelle machine, dans quel

endroit ? La température, les chocs, etc peuvent aussi être enregistrés. Jusqu'aux déchets des familles qui peuvent être pesés et suivis grâce à des puces électroniques sur la poubelle et les camions.

La traçabilité a profité de progrès majeurs, liés à l'informatique et à sa miniaturisation, avec notamment trois outils :

- les codes-barres, peux couteux, qui permettent une identification rapide et automatique par lecteur optique. La puce électronique qui peut contenir plus d'informations tend à les remplacer pour les usages sophistiqués.
- les radio-étiquettes (ou puces RFID) qui permettent un suivi complet de la vie d'un produit. En effet, elles sont à lecture/écriture et ce à distance (jusqu'à plusieurs mètres) d'une capacité de 64 000 caractères - 32 pages de livre environ - et peuvent se reprogrammer plusieurs millions de fois. L'alimentation et l'échange des données en lecture ou en écriture se font sur une porteuse inductive. La puce électronique n'est pas alimentée.
- pour les produits directement issus du règne vivant viandes, poissons, bois, champignons, etc. l'identification par l'ADN, via des puces à ADN commence à apparaître, pour le bois notamment (Tnah *et al.*, 2009).
- les bases de données plus ou moins interconnectées, permettant de suivre un grand nombre de références et d'effectuer des recoupements de manière automatisée.

1.6.4. Intérêts de la traçabilité

La traçabilité des produits et des composants a reçu une attention critique au cours des dernières années. Les exigences de différents segments de l'industrie alimentaire peuvent varier. Ils ont en commun qu'ils partagent la nécessité d'une documentation sans faille sur le suivi du produit du producteur, au fournisseur et au final au consommateur (Cebeci *et al.*, 2008).

La traçabilité joue un rôle important dans la qualité : si l'on s'aperçoit qu'un élément de production est défaillant, la traçabilité permet de savoir quels produits sont passés par cet élément, d'agir de façon curative sur ceux-ci pour assurer la conformité du produit (résolution du/des problèmes et remise en conformité, destruction, rappel, etc.) et de réaliser une analyse du problème en amont et aval

pour mettre en place des actions correctives. Elle est utilisée par exemple pour prévenir les risques liés aux produits agro-alimentaires, faire face aux possibles contrefaçons de médicaments, ou s'assurer de la non-nocivité de toutes sortes de produits (par exemple des jouets pour les enfants). La norme européenne UCC EAN 128 permet par exemple de standardiser la traçabilité en matière de santé, en particulier des médicaments ou des instruments chirurgicaux (www.tracenews.info).

En Europe : suite à plusieurs crises, dont celle de l'encéphalite spongieuse bovine, l'Union Européenne (UE) a mis en place le système d'alerte rapide RAPEX, un système informatisé qui recense tous les produits de consommation dangereux (http://ec.europa.eu/consumers/dyna/rapex/rapex_archives_fr.cfm). Le slogan « *De la fourche à la fourchette* » a dans les années 2000 recouvert un vaste programme de restructuration et coordination à échelle européenne de « *tous les aspects sensibles en la matière, à tous les stades de la filière agro-alimentaire: santé et alimentation animales, qualité des productions végétales (y compris les innovations OGM), sécurité des intrants agricoles (fertilisants, pesticides, etc.), qualité et surveillance des produits et denrées alimentaires transformés mis sur le marché (y compris les règles d'étiquetage), problématique de la sécurité alimentaire dans les échanges internationaux* ».

En janvier 2000, la Commission publiait une charte de base, le *Livre blanc sur la sécurité alimentaire* prévoyant un plan de réformes législatives visant des règles cohérentes et transparentes, un renforcement des contrôles et des avis scientifiques. Tout le droit existant devait être revu avant 2007 et rendu compatible avec la nouvelle juridiction communautaire sur la sécurité alimentaire.

En France, la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) a mis en place divers systèmes de traitement de données (dont données à caractère personnel) via notamment un système « *Alertes et signalements* » « *dont l'objet est la gestion des alertes RAPEX ou RASFF, des indices de danger et des signalements dans les secteurs alimentaires et non alimentaires* » (Arrêté du 7 Janvier, 2009), et le système IRIS (Intégration et restitution des informations saisies) « *dont l'objet est de rassembler dans une seule base des informations en provenance d'autres bases de données métier, de les traiter et d'en assurer la présentation* » (Arrêté du 7 Janvier, 2009).

La traçabilité permet aussi d'ajouter de la valeur aux produits, de créer de nouveaux services par l'innovation en utilisant la traçabilité comme levier stratégique

dans la gestion des biens des services et des personnes (identification, authentification, localisation, sécurisation, services associés) ainsi que des flux industriels.

Les systèmes de traçabilité ne doivent pas être perçus uniquement comme une barrière au commerce mais également comme une possibilité d'améliorer la gestion dans l'ensemble de l'industrie, la position sur le marché et l'avantage compétitif.

L'obligation de traçabilité peut être considérée comme une partie fondamentale du système HACCP (Analyse des dangers-points critiques pour leur maîtrise), puisque le système est sans signification sauf si les données sont enregistrées par rapport à un numéro de lot qui mentionne non seulement le jour et la période de la réception ou de l'envoi mais également l'origine de la matière première utilisée, et sa transformation, laquelle implique une obligation de traçabilité.

Les systèmes de traçabilité recouvrent de nombreux aspects, liés aux systèmes techniques, à la gestion, la réglementation, l'économie et la communication. Dans la pratique, les systèmes employés pour assurer la traçabilité ne sont pas imposés par la réglementation et vont des simples systèmes sur support papier aux solutions totalement automatisées basées sur les Technologies de l'Information.

1.6.4.1. Les perspectives économiques de la traçabilité

Les perspectives d'un point de vue économique sur la traçabilité reposent sur deux courants fondamentaux : la demande et l'offre. Dans le premier cas, l'objectif est de déterminer la volonté du consommateur de payer pour avoir une traçabilité, dans le dernier cas, il faut réfléchir aux implications de la traçabilité au niveau de l'entreprise. L'objectif de ces études est de déterminer les avantages et les coûts de la traçabilité, de savoir si les mécanismes du marché peuvent être utilisés pour atteindre un niveau efficace de traçabilité, et comment cela influence les relations de pouvoir des entreprises autonomes dans une chaîne d'approvisionnement.

Des coûts sont associés à la mise en œuvre du système (par exemple, les changements dans les procédures, diminution de la souplesse, et une augmentation des niveaux d'automatisation, de l'inventaire, le personnel et la documentation) et de son entretien (grâce à un audit). Les avantages de la traçabilité comprennent une transparence accrue, la réduction des risques de réclamations, une meilleure

logistique, un meilleur contrôle des épizooties, d'éventuels effets positifs sur le commerce, les licences de produits plus faciles, et des bénéfices possibles.

En Europe, la traçabilité a été principalement motivée par la réglementation, tandis qu'aux Etats-Unis, la motivation a été plus économique. Il existe plusieurs systèmes de traçabilité dans les industries agro-alimentaires. Les systèmes peuvent être caractérisés par trois dimensions : la profondeur « jusqu'à quel niveau et en aval du système GOES », par exemple, la largeur « combien d'attributs sont tracés », et la précision « dans quelle mesure l'origine est correctement identifiée » (Golan *et al.*, 2004).

Il existe différentes motivations pour introduire des systèmes de traçabilité : alors que les entreprises privées sont motivées par le profit, les pouvoirs publics sont plus intéressés par le bien-être social (Hobbs, 2004 ; Golan *et al.*, 2003). C'est pourquoi nous nous attendons à des différences entre les systèmes de traçabilité mis au point par des entreprises privées et ceux imposés ou influencés par les pouvoirs publics. Un bon niveau de traçabilité va donc dépendre de l'aspect obligatoire ou volontaire (Golan *et al.*, 2004).

La traçabilité à elle seule ne contribue pas à des niveaux plus élevés de sécurité ou d'autres attributs de la qualité mais elle permet de transférer uniquement des informations le long de la chaîne d'approvisionnement. Pour que la traçabilité puisse affecter la qualité, elle doit être associée à un certain mécanisme d'assurance qualité qui impose un ensemble de normes et de procédures, et précise les données à enregistrer, de sorte que la qualité puisse être assurée. Elle permet le partage de l'information enregistrée par les entreprises, ou par d'autres institutions à laquelle elle est associée, ce qui constitue l'essentiel de tout système de traçabilité (Füzesi *et al.*, 2009).

La traçabilité des aliments a été analysée à travers deux perspectives différentes : la recherche opérationnelle et l'économie. Dans la recherche opérationnelle et en sciences de gestion, la traçabilité est considérée comme un système d'information conçu pour coordonner les informations entre les différentes divisions d'une entreprise, par exemple, pour formuler un problème d'optimisation qui minimise la taille des lots de production en cas de rappel dû à un danger (Souza-Monteiro et Caswell, 2004).

1.6.5. La traçabilité agroalimentaire

La traçabilité agroalimentaire est l'application des principes de traçabilité à la filière agroalimentaire, afin d'atteindre des objectifs de sûreté alimentaire.

1.6.5.1. Définition

Le comité du Codex Alimentarius a défini et révisé la traçabilité des produits comme suit : « *La traçabilité correspond à la capacité de suivre les déplacements d'un aliment parmi des stades précis de la production, de la transformation et de la distribution* » (Comité du Codex Alimentarius « ALINORM 04/27/38 », 2004).

1.6.5.2. Quels éléments devraient être tracés dans la chaîne alimentaire ?

Les systèmes de traçabilité visent à documenter l'histoire d'un produit le long de la chaîne de production depuis les matières premières jusqu'au produit final prêt à être consommé. Le champ d'application de ces systèmes n'est pas limité à la capacité de détecter et de suivre les lots de produits à haut risque, mais pour soutenir les processus d'assurance de la qualité des produits. La qualité est définie comme « *l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites* ». Par conséquent, dans le domaine de la sécurité alimentaire, la traçabilité peut être définie comme « *la capacité de documenter tous les éléments pertinents - les mouvements, les processus, les contrôles - nécessaires pour définir l'histoire de la vie d'un produit* ». Ainsi, nous pouvons résumer ce qui doit être tracé dans la chaîne alimentaire :

1. TOUS les documents et les ingrédients utilisés ;
2. Les processus de production ;
3. Le personnel participant ;
4. Les produits finaux.

1.6.5.3. Les buts de la traçabilité dans la chaîne alimentaire

En ce sens, la traçabilité 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 (Raspor, 2002) et pour évaluer et gérer efficacement les risques.

La traçabilité est une aide à la maîtrise de la qualité des aliments par rapport à une norme connue et leur origine (Raspor, 2003). Si nous revenons à la définition des objectifs de la traçabilité des aliments, elle met en avant les points suivants :

1. Accroître la sécurité des produits ;
2. Identifier la source d'une contamination possible ;
3. Faciliter la procédure de rappel des produits ;
4. Maîtriser les risques de santé publique découlant de la consommation de produits.

1.6.5.4. Législation

La traçabilité est aujourd'hui devenue la préoccupation constante et obligatoire (Règlement CE N° 178/2002) pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire. Les producteurs, transformateurs, distributeurs doivent identifier et résoudre les points critiques, respecter les réglementations, effectuer des autocontrôles (Règlement CE N°2073/2005) ; les services publics doivent établir et faire respecter les réglementations relatives à la maîtrise de l'hygiène ; les consommateurs doivent être informés de la nature des produits.

Le Traité de Rome ne comporte que quelques dispositions sur la politique sociale, considérée alors comme un prolongement des mesures économiques. Il ne contient pas de dispositions pour les consommateurs. Jusqu'à 1972, pour la première fois le Conseil des ministres de la Communauté Économique Européenne (CEE) a discuté sur la nécessité de protection et d'information des consommateurs. Mais il faudra attendre l'Acte unique européen de 1986, ainsi que le Traité de Maastricht de 1992 pour que la Communauté Européenne (CE) se fixe comme objectif, dans son article 153 (ex-article 129A) le principe suivant « Afin de promouvoir les intérêts des consommateurs et d'assurer un niveau élevé de protection des consommateurs, la Communauté contribue à la protection de la santé, de la sécurité et des intérêts économiques des consommateurs ainsi qu'à la promotion de leur droit à l'information, à l'éducation et à s'organiser afin de préserver leurs intérêts » (Ferrier, 1996).

La CEE a produit depuis 1993 une série de réglementations imposant aux producteurs de denrées alimentaires de mettre en place des mesures visant à assurer un niveau de protection élevée de la sécurité alimentaire du consommateur ; ces règlements CEE s'appliquent aujourd'hui à l'ensemble des pays membres et donc des pays exportateurs vers l'Union Européenne.

- En 1992, la Directive 1992/59/CEE du 29 juin 1992, ou Directive européenne pour la sécurité alimentaire générale spécifie que la sécurité de tous les produits doit être garantie. Disposer d'un système pour le retrait des produits en rayon des points de vente doit également être prévu. Ceci est aussi réglé dans la Directive 1992/59/CEE et implique une bonne traçabilité.
- En 1993, la directive CEE HYGIENE 93/43.
- En 2002, le règlement CE 178/2002 (article 18 sur la Traçabilité de la General Food Law ; règlement européen visant à standardiser la législation en matière de denrées alimentaires dans l'UE, s'appliquant à toutes les entreprises de la chaîne alimentaire y compris les producteurs d'aliments pour animaux mais à l'exception des cultivateurs de plantes... entré en vigueur le 1 janvier 2005). *L'article 18 exige la traçabilité des denrées alimentaires, des aliments pour animaux, des animaux producteurs de denrées alimentaires et de toute autre substance destinée à être incorporée ou susceptible d'être incorporée dans des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux, et ceci à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution. Les exploitants du secteur alimentaire doivent être en mesure d'identifier toute personne leur ayant fourni une denrée alimentaire et d'identifier les entreprises auxquelles leurs produits ont été fournis. A cet effet, ces exploitants doivent disposer de systèmes et de procédures permettant de mettre l'information en question à la disposition des autorités compétentes, à la demande de celles-ci. Avec ce règlement, la traçabilité devient une obligation réglementaire qui s'ajoute à une autre obligation : celle de mettre sur le marché des denrées sûres.*
- Au 1^{er} janvier 2006, la nouvelle réglementation européenne CEE 853/2004 sur l'hygiène et la sécurité des aliments, nommée en France le 'Paquet Hygiène', va remplacer l'ensemble des directives progressivement adoptées depuis 1964. D'autre part, elle concerne toute la filière alimentaire, de la fourche à la fourchette. Son objectif général est en effet de mettre en place une politique unique et transparente en matière d'hygiène applicable à toutes les denrées alimentaires et à tous les exploitants du secteur, y compris ceux de l'alimentation animale.
- A ce jour, la réglementation en vigueur dans l'Union Européenne impose la fourniture de certificats sanitaires qui doivent accompagner tous les produits alimentaires importés vers l'UE (Règlement CE N° 1664/2006). Un modèle de certificat sanitaire est établi pour chaque pays tiers (Thaïlande : 94/325/CE ;

Malaisie : 96/608/CE ; Vietnam : 1998/813/CE). Ce document, qui est vérifié par la douane lors de chaque arrivage, comporte 4 grands chapitres : identification des produits, origine des produits, destination des produits et attestation sanitaire.

1.6.5.5. La traçabilité des fruits et légumes

Actuellement, il y a d'une part des réglementations générales concernant l'étiquetage et la traçabilité des produits alimentaires, d'autre part, il existe des réglementations spécifiques pour l'étiquetage des fruits, légumes et pommes de terre. La première réglementation générale est la loi du 14 juillet 1991 des Affaires économiques sur les pratiques du commerce et sur l'information et la protection du consommateur. Celle-ci donne plus d'informations générales sur la dénomination, la composition et l'étiquetage des produits et services, l'appellation d'origine, l'obligation d'information à l'égard du consommateur.

En ce qui concerne les réglementations spécifiques, il y a le Règlement européen CE 2200/96 pour l'organisation commune des marchés dans le secteur des fruits et légumes frais. Cette législation donne un aperçu des règles pour le classement des produits par catégorie de qualité, des règles de calibrage, de présentation et de marquage des fruits et légumes frais. Elle tient aussi compte des normes CEE/ONU (Commission économique de l'Europe au sein des Nations Unies). En complément à cette législation, il y a le Règlement CE 1148/2001 qui concerne les contrôles de conformité aux normes de commercialisation applicables dans le secteur des fruits et légumes frais. Celui-ci a été établi pour contrôler les normes imposées dans le secteur des fruits et légumes, à l'exception des contrôles menés au stade de la vente au détail au consommateur final.

Spécifique pour les pommes de terre, des normes ont été fixées dans l'AR du 30/11/1999 relatif au commerce des pommes de terre primeur et de conservation. Ces normes s'inspirent également des normes CEE/ONU (GS1 Belgique et Luxembourg, 2006).

1.7. La géotraçabilité

1.7.1. Définition

La géotraçabilité peut se définir comme le résultat de l'association de l'information géographique et des données traditionnelle utilisées dans les procédures de traçabilité. Dans le secteur agroalimentaire et plus particulièrement

dans celui des productions végétales, la géotraçabilité s'intéresse aux relations existant entre une parcelle de production, sa localisation géographique, son environnement et les pratiques culturelles. La géotraçabilité nécessite la mise en œuvre de l'analyse spatiale et d'outils d'acquisition et de traitement de l'information qui seront associés dans des Systèmes d'Information Géographique (SIG) (GeoTraceAgri, 2005).

1.7.2. Qu'est ce que permet la géotraçabilité ?

La mondialisation et la globalisation des échanges sont-elles synonymes d'une standardisation dans laquelle les produits alimentaires déracinés de leur terroir ne seront plus différenciés que par des marques de fabricants ou de distribution ?

Les produits alimentaires d'origine font partie du patrimoine des territoires et les consommateurs sont de plus en plus attirés par l'authenticité.

Les consommateurs sont demandeurs d'information sur l'origine des produits qu'ils consomment. Afin de garantir leur confiance, la détermination de l'origine géographique doit permettre de protéger des produits dont l'origine est déclarée, les systèmes de production labellisés et de prévenir les fraudes par rapport au cahier des charges des producteurs, des transformateurs et des distributeurs. Donc, la détermination de l'origine géographique est considérée comme un élément clef de la traçabilité.

Le Royaume-Uni Food Standards Agency (FSA) affiche un rapport intéressant sur l'étiquetage qui montre que les consommateurs appuient fortement une demande d'indication du pays d'origine sur les étiquettes (Food Standards Agency, 2007).

La géotraçabilité ne consiste pas seulement à associer des coordonnées géographiques aux informations sur la parcelle cultivée. L'élément clef est la définition d'indicateurs spécifiques de géotraçabilité qui apportent une vision synthétique. Ces indicateurs permettent de simplifier l'information et la communication vers l'utilisateur final grâce à l'analyse spatiale de l'information sur le produit et sa parcelle de production dans un Système d'Information géographique (SIG). Comme tout indicateur, l'indicateur de géotraçabilité prend en compte des critères variés reposant sur des informations fiables et accessibles utiles pour valider des objectifs ou des réponses à des questions que se pose l'utilisateur final (GeoTraceAgri, 2005).

Ainsi la détermination de l'origine géographique peut se révéler essentielle dans le traitement des caractéristiques de qualité des produits, l'assurance de l'authenticité et la traçabilité dans la chaîne de production.

1.7.3. Objectifs

Les objectifs tels qu'ils ont été définis dans le cadre du projet européen GeoTraceAgri (GTA) concernent principalement la traçabilité amont (Figure I.9, Figure I.10) :

- ✓ Promotion de la qualité et de l'origine des productions ;
- ✓ Valorisation des pratiques agricoles définies à partir de spécifications écrites (cahier des charges) imposées et certifiées par les acteurs du secteur dans chaque pays ;
- ✓ Une meilleure gestion des risques en matière de qualité et de sûreté alimentaire (impact sur l'environnement du produit, respect des spécifications écrites).

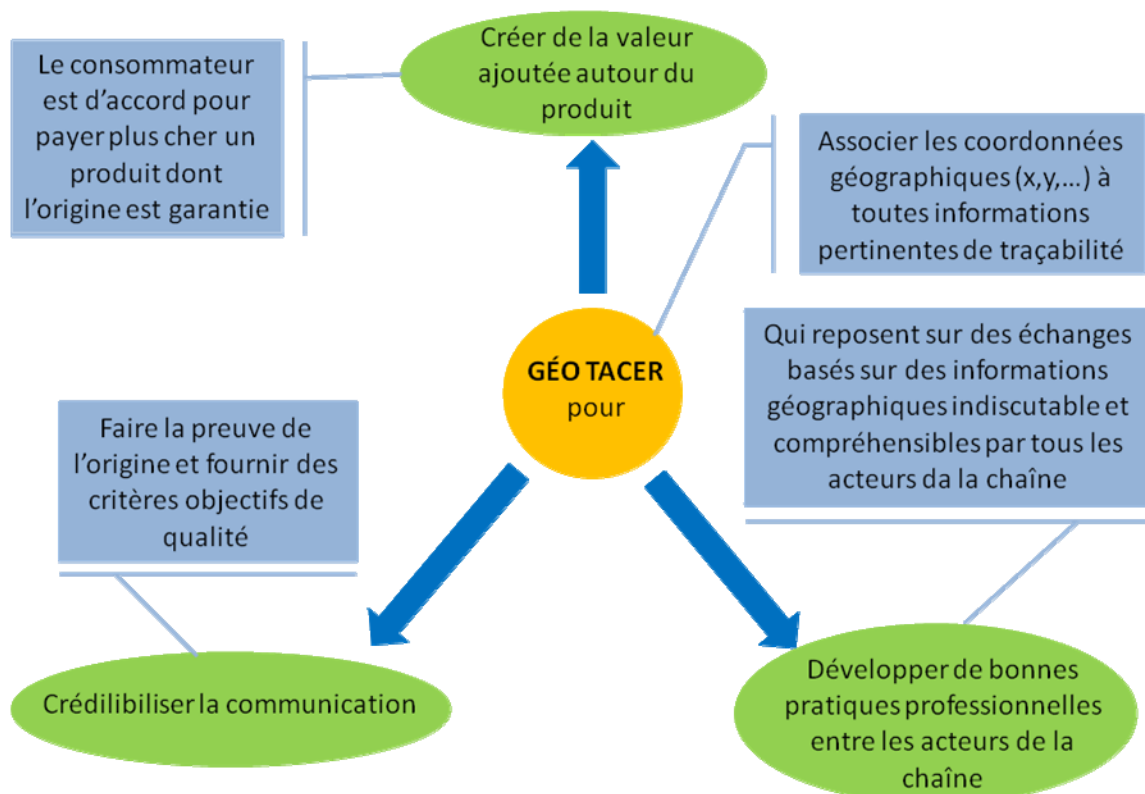


Figure I.9 : Les objectifs de création de valeur ajoutée pour les producteurs et fabricants d'aliments (Source : GeoTraceAgri, 2005)

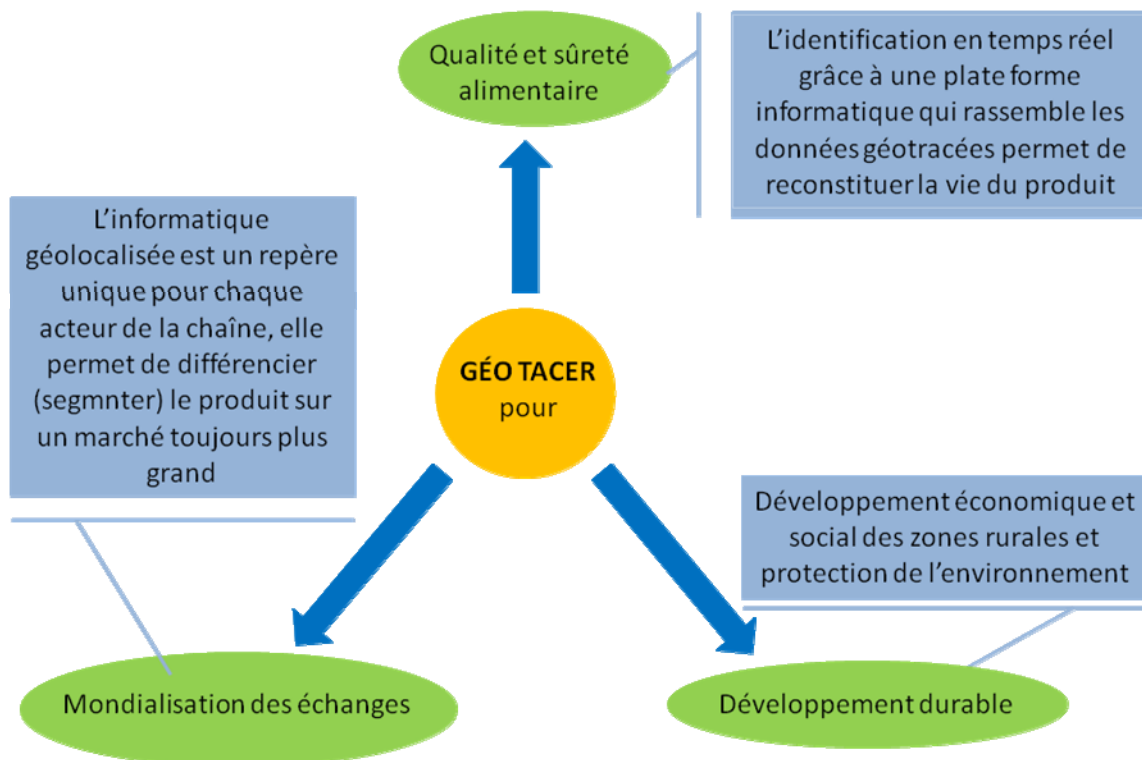


Figure I.10 : Les enjeux stratégiques couverts par le géotraçabilité
(Source : GeoTraceAgri, 2005)

1.7.4. Biomarqueurs

La traçabilité ne peut être résolue sans identification de marqueurs d'origine géographique. Nous avons choisi d'étudier les marqueurs d'origine biologique que nous appellerons communément biomarqueurs. Nous avons émis l'hypothèse en début de thèse que les biomarqueurs sont en effet liés aux régions de production et aux systèmes de production des aliments. De plus, ils sont liés directement à la sûreté des denrées alimentaires au cours de leur production ou de leur consommation.

1.7.4.1. Définitions des biomarqueurs

Il existe de nombreuses définitions des biomarqueurs :

- Une réponse biologique à un produit chimique issu de l'environnement (Walker, 1997) ;

- Un caractère biochimique, physiologique ou histologique qui change ou une aberration dans un organisme qui peut être utilisé pour estimer l'exposition aux produits chimiques ou les effets qui en résultent (Hugget *et al.*, 1992) ;
- Un changement dans une réaction biologique qui peut être lié à une exposition ou à un effet toxique d'un produit chimique de l'environnement (Peakall, 1999) ;
- Des mesures fonctionnelles liées à l'exposition à des stress environnementaux, qui sont généralement exprimés au niveau sub-organismal (Adams, 2002) ;
- En médecine et pharmacie, il existe également de nombreuses définitions, comme «une mesure pharmacologique ou physiologique qui est utilisée pour prédire un événement toxique chez un animal» ou «un caractère biochimique spécifique dans le corps, qui a une caractéristique moléculaire particulière qui le rend utile pour mesurer les progrès de la maladie ou les effets du traitement» (<http://www.hyperdictionary.com/medical/biomarkers>).

1.7.4.2. Intérêts des biomarqueurs

L'idée d'utiliser des biomarqueurs d'exposition est qu'ils pourraient fournir, dans certains cas, une méthode plus précise pour évaluer l'exposition et, en définitive, le risque (Schulte et Waters, 1999). Bien que l'utilisation de biomarqueurs puisse réduire les erreurs de classification, il est également possible que l'erreur de mesure, pour un biomarqueur particulier, puisse induire une erreur sur l'origine du produit (White, 1997 ; Saracci, 1997). Cependant, de bonnes pratiques de laboratoire peuvent réduire ce problème au minimum. La validité des marqueurs biologiques est la force de conduite ultime de leur applicabilité (Raspor, 2004).

Les pratiques actuelles d'élaboration de nouveaux aliments nous obligent à développer de nouveaux systèmes analytiques rapides et peu coûteux. Leur développement serait un bénéfice énorme pour l'industrie alimentaire moderne et pour la santé des consommateurs. Des identificateurs primaires de produits alimentaires, basés sur des marqueurs biologiques, pourraient être des facteurs anatomiques, physiologiques, biochimiques, ou des paramètres moléculaires qui permettraient d'assurer une traçabilité complète tout au long de la chaîne alimentaire.

L'éventail des caractéristiques que devraient avoir les biomarqueurs :

- Leur mesure devrait être facile et relativement peu coûteuse, permettant leur quantification dans les produits alimentaires ;

- La dose de biomarqueurs devraient être indépendante du temps pour permettre des corrélations et des comparaisons ;
- Les biomarqueurs devraient être sensibles à des concentrations pertinentes ;
- La dose de biomarqueurs devraient être indépendante des facteurs environnementaux ;
- Les biomarqueurs devraient être adaptés à la surveillance post-commercialisation afin de confirmer la validité de l'origine des produits alimentaires.

1.7.4.3. Méthodes analytiques permettant de mesurer les biomarqueurs

Il faut imaginer des méthodes analytiques qui prennent en compte des éléments de l'environnement de l'aliment que l'on pourrait retrouver dans l'aliment final. Nous devons faire avec les possibilités des différentes techniques et méthodes disponibles:

1. Techniques mettant en œuvre l'ADN ;
2. Techniques enzymatiques ;
3. Techniques d'immunoaffinité ;
4. Technologie d'absorption dans le proche infra-rouge ;
5. Spectroscopie RMN appliquée à l'authentification des aliments ;
6. Spectrométrie de masse de rapport isotopique (IRMS) ;
7. Techniques spectrophotométriques ;
8. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
9. Chromatographie liquide haute pression (HPLC).

1.7.4.4. Techniques mettant en œuvre l'ADN

Jusqu'à présent, l'identification biologique des individus était basée sur des caractères non visibles de l'expression de gènes identifiables (typage des groupes sanguins, analyse du profil électrophorétique de certaines protéines ou enzymes) dont la transmission au cours des générations peut être facilement analysée. Néanmoins, ces marqueurs phénotypiques sont souvent peu polymorphes et, dans les populations dont le taux de consanguinité est plus ou moins élevé, ils peuvent se montrer inadéquats pour les tests d'identité ou de parenté. Par ailleurs, ils ne peuvent être mis en évidence qu'à partir de tissus dans lesquels ils sont exprimés, et généralement à partir d'échantillons fraîchement récoltés.

En raison de la dégénérescence du code génétique (à un acide aminé correspondent plusieurs codons), le polymorphisme présent au niveau de l'ADN constituant les gènes est toujours plus élevé que celui observable au niveau du produit des gènes (les protéines). C'est pourquoi la méthode d'empreintes génétiques est basée sur la mise en évidence des polymorphismes au niveau de l'ADN. Cet ADN, source des marqueurs génotypiques, constitue donc le meilleur matériel d'étude pour différencier les êtres vivants (Portetelle *et al.*, 2000).

Les techniques de génétique moléculaire offrent des perspectives d'identification et de traçabilité des individus et de leurs produits sous formes d'« empreintes génétiques » (DNA fingerprinting). L'analyse des microsatellites de l'ADN permet d'obtenir une empreinte génétique fournissant une information quasi infaillible quant à l'identité et la parenté des individus. Les microsatellites sont des séquences courtes répétées en tandem et caractérisées par un grand nombre d'allèles (une dizaine) qui diffèrent par le nombre des répétitions. Cette information peut être obtenue à partir de très peu de matériel biologique. Cette méthode s'avère être à l'heure actuelle une méthode fiable, pratique, de coût raisonnable pour identifier et certifier les produits alimentaires transformés ou non. Elle peut être appliquée dans certains cas où les aliments sont génétiquement adaptés à leur environnement (cas du poisson) et à l'authentification de l'origine (China *et al.*, 2004).

Récemment, des études de métagénomique, c'est-à-dire permettant d'analyser l'ADN d'une façon plus globale ont vu le jour. Ces méthodes ont un certain nombre d'avantages par rapport aux approches traditionnelles (1) l'ADN ou des fragments d'ADN peuvent subsister aux traitements thermiques (supérieur à 120°C), (2) Les séquences d'ADN sont uniques pour un organisme donné; (3) Des méthodes basées sur l'ADN sont quantitative en plus d'être qualitative (Burns *et al.*, 2004 ;. Woolfe, 2007).

En théorie, des échantillons d'ADN peuvent être recueillis dans tous les tissus biologiques. En pratique, l'échantillonnage d'ADN doit être obtenu à faible coût, doit être facile à réaliser et produire des échantillons dans un format adapté à l'analyse de laboratoire. Un certain nombre d'innovations ont vu le jour dans le domaine de l'utilisation de l'ADN, notamment dans l'identification des animaux vivants comme par exemple la proposition d'insérer une fraction d'ADN de l'animal dans des marqueurs auriculaires fixés sur l'animal. De plus, des systèmes sont en cours de

développement qui permettront l'analyse de l'ADN en ligne à des vitesses élevées rencontrées dans les usines d'abattage (Loftus, 2005).

Dans une autre étude, en réponse à la crise de confiance des consommateurs et à leur régulière désaffection pour la viande bovine Sancristobal-Gaudy (2000) et son équipe sont parvenus à proposer et à valider une méthode d'identification individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs moléculaires de type microsatellite. Plusieurs prélèvements ont été effectués sur des jeunes bovins de domaines expérimentaux INRA, in vivo et post mortem. La détermination des génotypes aux 11 loci, puis la comparaison deux à deux de ces génotypes à l'aide d'une méthode statistique adéquate prenant en compte les particularités des microsatellites a permis de recommander d'une part que le typage soit réalisé sur au moins huit marqueurs pour assurer une traçabilité parfaite, et d'autre part que des précautions indispensables soient prises concernant la qualité des prélèvements et la gestion des échantillons lors d'une mise en œuvre à grande échelle. Cette approche devrait permettre de sécuriser et de renforcer la nouvelle réglementation sur l'étiquetage des viandes de l'étable à l'étal.

1.7.4.5. Profil microbiologique

Les méthodes qui emploient l'analyse globale de la flore microbienne sont basées sur le principe que l'environnement a un effet sur la communauté microbienne de l'aliment et que cette communauté serait retrouvée conservée dans l'aliment. Les populations bactériennes pourraient constituer des « marqueurs microbiologiques » permettant d'identifier l'origine de tous types de produits alimentaires en utilisant la diversité ou les communautés microbiennes présentes dans ces produits. Généralement, le but de l'analyse microbiologique des produits alimentaires est d'évaluer la présence possible de bactéries ou d'organismes pouvant avoir des conséquences sur la santé du consommateur et de donner une idée de la qualité hygiénique des aliments en relation avec l'application des bonnes pratiques de fabrication comme le respect de la chaîne du froid, l'hygiène des personnels et des équipements au cours de la manutention et des procédés de fabrication (Huss, 1995). Pour établir la traçabilité des fruits, les analyses microbiologiques à mettre en œuvre doivent permettre de dresser un inventaire aussi fidèle que possible des microorganismes présents sur les fruits pour relier leur relative composition à une identification d'origine. La question n'est pas d'identifier ou

de mesurer le niveau des populations microbiennes mais plutôt de relier la communauté microbienne (levures, moisissures) à l'origine géographique des fruits (El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c).

I.8. Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne

I.8.1. Méthodes traditionnelles

Les méthodes classiques de microbiologie nécessitent le plus souvent de disposer de souches pures vivantes et cultivables. Les différentes souches microbiennes sont isolées et purifiées sur des milieux de culture plus ou moins sélectifs dans des conditions d'oxygénation, de temps et de température, ou des additifs présents peuvent parfois limiter la croissance de certaines souches au détriment des autres. Pour des populations microbiennes assez homogènes qui ne comportent pas trop individus voire d'espèces ou de genre différents, ces méthodes donnent de bons résultats. Cependant, quand la diversité des flores augmente, il devient difficile d'isoler et de purifier tous les microorganismes présents dans un échantillon. Cette difficulté est d'autant plus importante que la part des souches anaérobies strictes est plus grande. Il n'existe pas de milieux et de conditions de culture universels permettant d'isoler la majorité des souches viables cultivables d'un échantillon intégrant l'anaérobiose et l'aérobiose.

Pour l'identification des microorganismes, les critères utilisés peuvent être morphologiques (macroscopique ou microscopique), biochimiques, sérologiques, lysotypiques ou génétiques en fonction de la finesse de l'identification recherchée.

Ces techniques d'analyse de la diversité microbiologique présentent l'inconvénient de ne donner qu'une vue restreinte ou une approximation grossière de la diversité naturelle. Ces problèmes sont connus depuis longtemps et ont été décrits sous le terme de « la grande anomalie du comptage sur boîte » (Staley et Konopka, 1985 ; Brock, 1987). Selon ces auteurs, entre 0,001 et 15% des bactéries présentes dans un échantillon sont cultivables à l'aide des techniques classiques (Tableau I.8).

Tableau I.8 : Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct (D'après Amann *et al.*, 1995)

Habitat	Cultivabilité (%) ^a
Eau de mer	0,001 – 1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1 – 1
Eau d'estuaires non pollués	0,1 – 3
Boues actives	1 – 15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

Ce décalage est à attribuer à différentes causes (Amann *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1998) :

- Le milieu de culture choisi ne peut être universel et l'ensemble des conditions environnementales ne peut être reproduit sur un seul et même milieu de culture en particulier pour l'environnement à forts gradients physico-chimiques.
- Certaines cellules hors de leur environnement peuvent être dans un état viable mais non cultivable. Cet état cellulaire correspond à une adaptation aux conditions de stress, notamment nutritionnel. Il s'accompagne de modifications physiologiques et structurales dont le rétablissement n'est pas simplement possible sur le milieu synthétique. Cet état peut être maintenu de plusieurs jours à plusieurs années.
- Des populations inférieures numériquement peuvent supplanter des populations majoritaires moins adaptées au milieu de culture.
- Des populations cultivées en liquide peuvent ne pas se développer sur milieu solide.
- La quantité d'inoculum choisie pour l'enrichissement influence le type de cellules enrichies.
- Des microorganismes différents ayant des conditions de croissance similaires seront difficilement distinguables.
- Certaines cellules sont impossibles à obtenir en culture pure comme c'est le cas des microorganismes symbiotes et syntrophes.

C'est pour ces raisons que des méthodes appelées de culture indépendante ont été développées afin d'améliorer les connaissances sur la biodiversité des populations microbiennes complexes.

1.8.2. Méthode d'analyse des flores microbiennes de culture-indépendante

Durant la dernière décennie, l'analyse de la composition de la communauté microbienne a évolué considérablement. Des approches de culture indépendante ont été développées grâce aux progrès en biologie moléculaire. Les méthodes moléculaires se caractérisent par leur rapidité et leur fiabilité. Ces techniques peuvent fournir un profil représentant la diversité génétique d'une communauté microbienne d'un environnement spécifique. La fonction écologique et la biodiversité des levures sont relativement peu connues par rapport à celles des autres micro-organismes (Herrera et Pozo, 2010). Pour les moisissures, ce manque d'information de base sur la diversité a des implications importantes pour de nombreux aspects de la biologie évolutive, par exemple, les hypothèses phylogénétiques, le rôle que joue la biodiversité face aux perturbations, les relations et les processus de coévolution, l'interprétation des modèles biogéographiques, des programmes de dépistage, etc (Mueller et Bills, 2004; Hawksworth et Mueller, 2005). L'identification des levures et des moisissures basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ARN 26S et 28S ribosomaux est devenue un outil très performant pour étudier les communautés des levures et moisissures dans les échantillons environnementaux (Cocolin *et al.*, 2002a ; Hesham *et al.*, 2006 ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008).

Dans le chapitre suivant, je me propose de décrire ces techniques après avoir présenté les molécules analysées que sont les ARN ribosomiques (ARNr).

1.9. Les acides nucléiques et les techniques de biologie moléculaire en communauté microbienne

1.9.1. Le développement des techniques moléculaires

L'émergence des techniques moléculaires en communauté microbienne est liée au développement de la phylogénie moléculaire à la fin des années soixante (Zuckerland et Pauling, 1965). A la fin des années quatre-vingt, l'ARN ribosomique (ARNr) a été choisi comme marqueur évolutif et pour évaluer les relations phylogénétiques des divers organismes tels que les procaryotes et les eucaryotes (Lake, 1987; Woese, 1987). Les premières études de communauté microbienne par

biologie moléculaire proviennent de Bruns *et al.* (1989) et Guého *et al.* (1990). Ils ont comparé les séquences des ARNr pour établir les liens phylogénétiques entre les espèces d'un écosystème de levures et d'un écosystème de moisissures.

1.9.2. Etude des ARN ribosomiques (ARNr)

En 1968, Kimura a émis le concept d'horloge « évolutionnaire » : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Le taux d'accumulation des mutations est dicté par l'intensité de la pression de sélection et il est du même ordre de grandeur dans des domaines homologues du génome (région soumise à la même pression de sélection). Ainsi les gènes à mutation rapides vont pouvoir refléter des événements évolutifs récents alors que les gènes très conservés seront les témoins d'un passé très éloigné. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre phylogénique en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles.

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est-à-dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés, il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations seront accumulées en quelques millions d'années.

Les ARN ribosomiques (ARNr) sont formés de sous unités pouvant se grouper en polyosomes. Ces éléments sont caractérisés par leur constante de sédimentation exprimée en Svedberg (S). Chez les eucaryotes, les ARNr s'associent à des protéines pour former les ribosomes qui sont constitués d'une sous-unité 40S et d'une sous-unité 60S. La sous-unité 40S contient de l'ARNr 17/18S et la sous-unité 60S contient de l'ARNr 5S, 5.8S et de l'ARNr 26/28S (Musters *et al.*, 1990). L'ARNr 5S est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARNr 28S est formé d'environ 4700 nucléotides, l'ARNr 5.8S est formé d'environ 160 nucléotides et l'ARNr 18S comprend environ 1900 nucléotides (Alberts *et al.*, 2002). Dans le ribosome, les molécules d'ARNr, qui sont repliées en une structure secondaire, peuvent être

représentées à partir des études comparatives des séquences primaires (Musters *et al.*, 1990). Une modification de la séquence primaire de l'ARNr va influencer directement sa structure secondaire. Pour maintenir la fonctionnalité de la molécule, la structure secondaire de l'ARNr doit être conservée dans l'ensemble du monde vivant par le biais de mutations compensatoires (Hancock *et al.*, 1988).

1.9.3. Le choix de l'ARNr 26/28S

Le choix de la grande sous-unité de l'ARNr (26/28S) peut être expliqué par plusieurs raisons (Hassouna *et al.*, 1984 ; Hancock *et al.*, 1988 ; Kurtzman et Robnett, 1998 ; Seifert, 2009 ; Khot *et al.*, 2009) :

- Sa présence est universelle et il y accomplit le même rôle chez tous les organismes.
- Il a une structure bien conservée car toutes modifications pourraient avoir des conséquences importantes sur les synthèses protéiques.
- Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés.
- La grande sous-unité de l'ARNr (26/28S) est particulièrement appropriée pour étudier la relation entre la séquence primaire et structure secondaire parce que leurs structures sont beaucoup plus variables que ceux de la petite sous-unité de l'ARNr.
- Il est relativement facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules.
- Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.
- Sa séquence est facilement obtenue par des méthodes standards d'extraction et de séquençage.

Actuellement, le gène codant pour l'ARNr 26/28S est un des marqueurs d'espèce le plus utilisé. Il est en effet possible de définir des amorces universelles pour son amplification (Cocolin *et al.*, 2002a ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008 ; El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha et Montet,

2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c). Le travail d'identification initiale phylogénétique et moléculaire sur les eucaryotes a commencé avec des gènes ribosomiques nucléaires. La grande sous-unité LSU qui est dénommée 26S pour les levures ou 28S pour les moisissures possède deux sous-régions variables appelées D1 et D2 qui sont beaucoup plus variables que celles des petites unités de l'ARNr (Figure I.11). Les LSU sont devenus la norme pour l'identification des espèces des microorganismes eucaryotes (White *et al.* 1990).

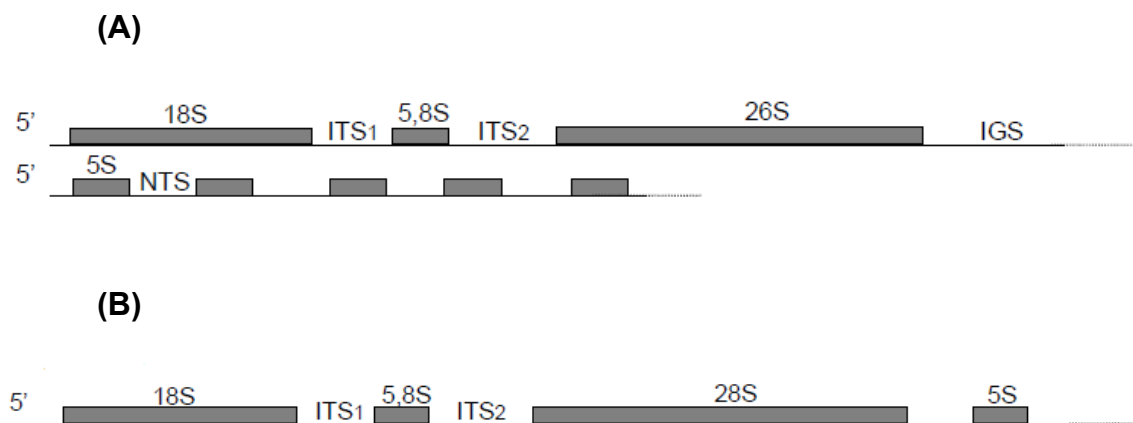


Figure I.11: Représentation de l'ARNr de *Saccharomyces cerevisiae* montrant les gènes d'intérêt 26S et 28S et les régions codantes. (A) les gènes d'ARNr 26S sont organisés différemment chez les levures et les plantes. (B) Les gènes des ARNr 28S sont spécifiques des moisissures (Source : Martins et Wasko, 2004)

1.9.4. Les techniques moléculaires dites d'« empreinte génétique »

Ces techniques permettent de comparer plus facilement des échantillons et d'évaluer rapidement la diversité microbienne d'un écosystème. La détection des séquences de l'ADNr 26/28S est une empreinte de la présence des microorganismes. Elle ne renseigne pas sur la viabilité des cellules ni sur leur activité métabolique. L'ADN de cellules mortes peut persister temporairement dans l'environnement et de nombreuses cellules peuvent se trouver dans un état de dormance. Le contenu en ARNr des cellules d'une population donnée est corrélé au taux de croissance de ces cellules et réagit rapidement aux variations des conditions environnementales (Ward *et al.*, 1990). Cependant, la sensibilité des molécules d'ARNr à la dégradation par les RNases rend l'isolement et la manipulation des molécules d'ARN plus délicats que pour les molécules d'ADN (Von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Les méthodes d'identification traditionnelles qui sont basées sur des essais laborieux et physiologiques échouent souvent pour la détermination des espèces. Afin d'étudier les structures et la dynamique de la population, les techniques d'empreintes génétiques sont nécessaires (Muyzer, 1999). Ces dernières années plusieurs techniques moléculaires d'analyses de fragments d'ADN sont utilisées avec succès sur les espèces des champignons (Barszczewski et Robak, 2004 ; Pina *et al.*, 2005). Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN de l'écosystème. Le mélange de fragments de produit de PCR est ensuite analysé par diverses techniques d'électrophorèse soit par les méthodes basées sur l'analyse de la taille des fragments (RAPD, ARDRA, RFLP, AFLP), soit par les méthodes basées sur la séquence nucléotidique des fragments (SSCP, TGGE/DGGE, DHPLC).

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) est une technique d'analyse du génome entier qui utilise plusieurs amorces courtes de séquences définies arbitrairement. Ces amorces s'hybrident aléatoirement en de multiples sites d'une matrice d'ADN (Wikström *et al.*, 1999). Les amorces sont choisies pour amplifier le plus grand nombre de fragments dont la taille est distribuée de façon homogène entre 50 et 1000 nucléotides. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ. Un intérêt de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissance préalable de l'ADN cible. La RAPD qui a été appliquée aux champignons, basée sur l'analyse des séquences des gènes ARNr D1/D2 (26S), (ITS1, ITS2) et (5.8S) a permis d'établir que c'est la façon la plus fiable d'identifier les champignons (Kurtzman et Robnett, 1998, Lopandic *et al.*, 2006 ; Midorikawa *et al.*, 2008). La RAPD est donc une technique très discriminante (Alcoba-Flórez *et al.*, 2007). Cependant les profils obtenus sont difficilement comparables entre différents laboratoires même si les conclusions peuvent être extrapolées correctement (Figure I.12).

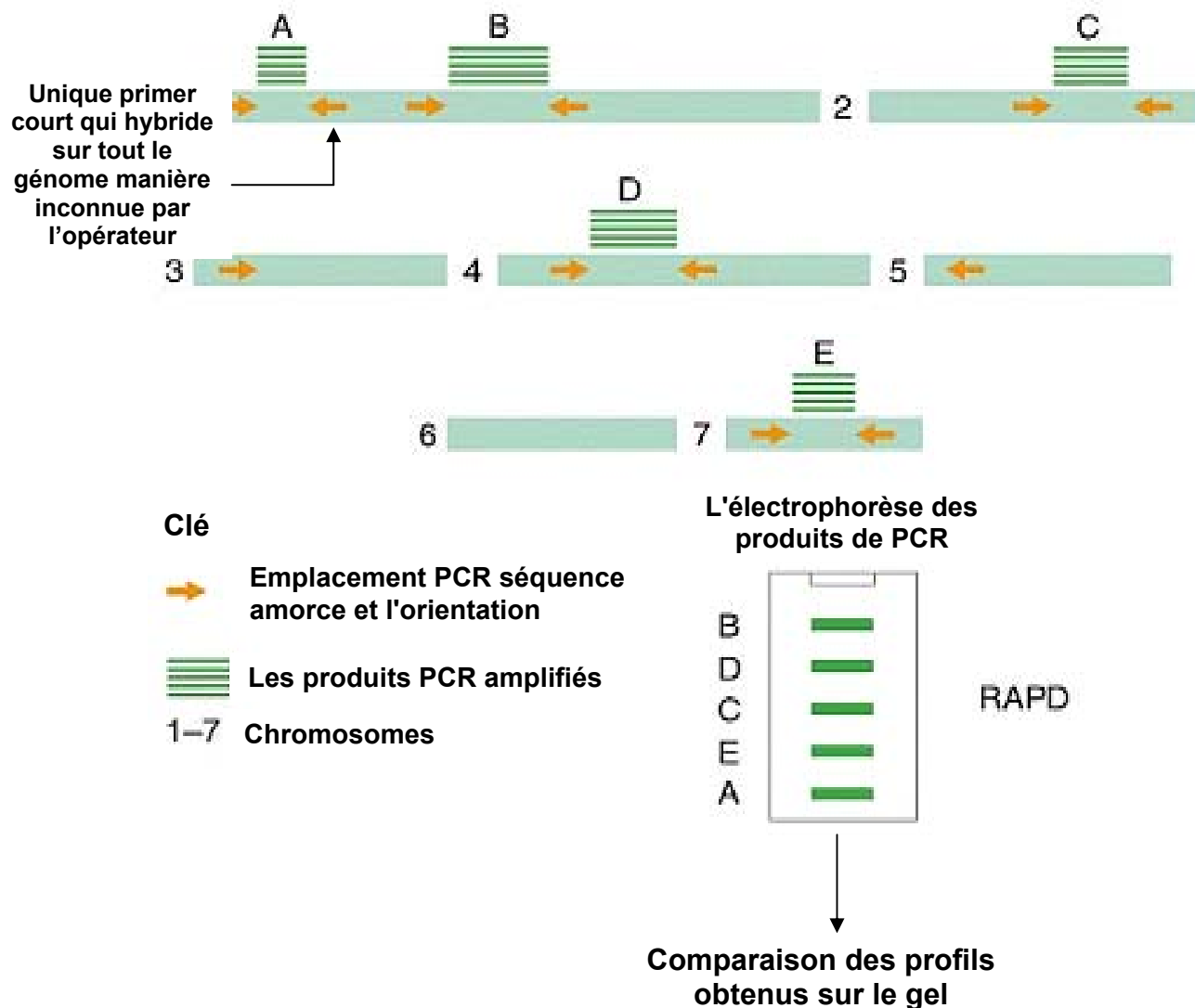


Figure I.12: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

La technique d'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) est une technique basée sur la digestion enzymatique des ADNr amplifiés par certaines enzymes de restriction. L'ARDRA a été décrite comme simple et rapide, reproductible et discriminante au sein de la gamme d'espèces étudiées. Les séquences d'ADN conservés et variables, nécessaires à la différenciation des espèces en utilisant des amorces universelles, se trouvent dans les gènes codant pour l'ARNr chez les procaryotes et les eucaryotes. Les méthodes d'identification décrites pour les champignons sont basées sur des séquences de la petite 18S et grande 28S sous-unités d'ADNr et sur les trois régions internes espaceurs intergéniques ITS1, ITS2, IGS qui hébergent le gène 5.8S entre ITS1 et ITS2 (White *et al.*, 1990). Bien que l'ARDRA fournisse peu ou pas d'informations sur le type de

micro-organismes présents dans l'échantillon, elle peut être employée pour une évaluation rapide des changements génotypes de la communauté avec le temps, ou comparer les communautés dans différentes conditions environnementales.

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par l'ADN. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un ADN sonde, provenant souvent de banques d'ADN génomique ou complémentaire. Cette technique donne accès à un nombre très élevé de marqueurs distribués le long du génome. La technique RFLP est basée sur la différenciation entre micro-organismes par la comparaison des profils de restriction obtenus par digestion d'un ADN cible choisi avec des endonucléases de restriction. Le degré de similitude des motifs générés permet d'établir des corrélations entre les espèces, tandis que l'existence de motifs uniques permet leur utilisation comme marqueurs d'identification. Ces méthodes ont été utilisées avec succès pour distinguer les espèces de champignons (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999 ; Sabate *et al.*, 2002 ; Deak *et al.*, 2004 ; Pinto *et al.*, 2004). Cette technique a été appliquée avec succès grâce à l'utilisation des espaceurs intergéniques ITS1 et ITS2 de l'ADNr, et le gène 5.8S de l'ARNr (Kurtzman, 1994 ; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Le gène 5.8S a une séquence hautement conservée qui montre une faible variabilité intraspécifique qui n'est pas suffisante pour discriminer des souches microbiennes. Par contre, les régions ITS, qui sont hypervariables, pourraient permettre, selon le cas, l'identification au niveau intra ou interspécifique. Cette technique est souvent utilisée en combinaison avec la PCR et est appelée PCR-RFLP. Dans cette méthode combinatoire, des fragments d'ADN spécifiques sont tout d'abord amplifiés par PCR puis, ces amplicons sont digérés par des endonucléases de restriction pour obtenir des modèles spécifiques (Dendis *et al.*, 2003 ; Llanos-Frutos *et al.*, 2004).

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une méthode qui a été démontrée comme fiable et reproductible pour l'identification des espèces de champignons (Ball *et al.*, 2004).

La SSCP et la DGGE/TGGE sont des techniques d'analyse de fragments d'ADN basées sur les différences de mobilité électrophorétique dues aux différentes conformations des fragments moléculaires d'ADN de même taille.

La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est basée sur le fait que dans un gel de polyacrylamide non dénaturant, les ADN simple brin même s'ils ne diffèrent entre eux que d'une base, peuvent adopter une conformation structurale suffisamment différente, pour qu'on puisse les détecter sous forme de deux bandes électrophorétiques distinctes. La SSCP permet de détecter le changement d'une seule base dans 99% des produits de PCR de 100 à 300 pb (Hayashi, 1991). Couplé avec l'amplification PCR, l'analyse SSCP peut être utilisée pour identifier rapidement les variantes d'une des séquences d'ADN définies. L'analyse par SSCP est exacte, simple et pourrait être utilisée pour évaluer rapidement la proportion, la dynamique et la diversité des communautés de champignons. Cette technique a été appliquée avec succès sur les régions de l'ADNr, ITS1 et 18S (Walsh *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1998 ; Callon *et al.*, 2006).

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est fondée sur la séparation d'un double brin d'ADN relié par un GC clamp dans un gel d'acrylamide en conditions de dénaturation croissante (Fischer et Lerman, 1983 ; Myers *et al.*, 1987). Deux molécules d'ADN proches, différant d'un seul nucléotide dans une zone à faible température de fusion, auront deux températures de fusion différentes. Lors d'une migration électrophorétique dans un gradient croissant de dénaturant, la mobilité décroît alors que les zones à faible température de fusion se dissocient.

La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) est basée sur le même principe que la DGGE mais le gradient dénaturant chimique est remplacé par un gradient de température qui augmente au cours de la migration (Zoetendal *et al.*, 1998 ; Eichner *et al.*, 1999).

Les techniques DGGE/TGGE permettent l'analyse simultanée de plusieurs échantillons permettant de suivre l'évolution de la communauté au fil du temps et l'espace (Muyzer, 1999 ; Nicolaisen et Ramsing, 2002). La DGGE a l'avantage que la séparation ne dépend pas de la taille du fragment, mais plutôt du comportement de fusion du produit PCR. La DGGE est donc plus discriminante que la RFLP (Moeseneder *et al.*, 1999). En outre, le profil de bandes obtenu à partir des produits PCR est indicatif des différentes espèces (Vaughan *et al.*, 1999) ou des assemblages d'espèces (Muyzer *et al.*, 1993) et permet ainsi de visualiser la diversité génétique des populations microbiennes, de quantifier les indices de la biodiversité (Simpson *et al.*, 1999; McCracken *et al.*, 2001) et le potentiel de trouver de nouveaux microorganismes non cultivables (Simpson *et al.*, 2000). Une des

caractéristiques fortes de la DGGE est la possibilité d'identifier les membres des communautés par le séquençage et la ré-amplification des bandes excisées directement à partir des gels ou par analyse d'hybridation avec des sondes spécifiques (McCracken *et al.*, 2001 ; Temmerman *et al.*, 2003), ce qui n'est pas possible avec la RFLP (Muyzer, 1999 ; McCracken *et al.*, 2001).

La PCR-DGGE est la technique la plus largement utilisée en œnologie et des limites de détection de 10^2 CFU/mL ont été signalées pour des cultures pures et de 10^4 CFU/mL dans du vin (Andorrà *et al.*, 2008 ; Cocolin *et al.*, 2000 ; Mills *et al.*, 2002 ; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Cependant, certains auteurs signalent logiquement que l'analyse PCR-DGGE est moins sensible que la culture sur gélose pour la détermination de la communauté des levures de raisins (Andorrà *et al.*, 2008).

Ces dernières années, les scientifiques ont utilisé la PCR quantitative en temps réel (qPCR) pour détecter et quantifier les microorganismes dans différents milieux alimentaires (Hein *et al.*, 2001 ; Blackstone *et al.*, 2003 ; Bleve *et al.*, 2003 ; Alcoba-Flórez *et al.*, 2007). Le principal avantage de la qPCR est le niveau de détection très faible approchant une cellule par mL.

Parmi les techniques moléculaires actuelles, la PCR associée à des techniques d'empreinte moléculaire est largement utilisée pour son pouvoir de discrimination et de reproductibilité élevées et parce qu'elle exige très peu de matériel de départ. Elles sont de plus rapides et simples à réaliser. En général, ces méthodes basées sur la PCR sont clairement plus sensibles que les méthodes en culture et sont généralement d'une efficacité comparable. Plusieurs protocoles de PCR permettent la détection et l'identification des espèces de champignons en moins de 24 h (Chang *et al.*, 2001 ; Shin *et al.*, 1997). Toutefois, la normalisation de l'extraction et la purification de l'ADN, ainsi que des produits de PCR, ne sont pas encore bien établies. À l'heure actuelle, la PCR en temps réel liée à l'émission de fluorescence semble être l'alternative la plus prometteuse. Elle présente les avantages de la quantification de la charge en champignons et la minimisation de la manipulation des échantillons, et atténue le risque de résultats faussement positifs.

Dans le chapitre suivant, je me propose de décrire en détail la technique de PCR-DGGE, qui est la principale technique utilisée dans mon travail, ainsi que son application en communauté microbienne.

I.10. La méthode de PCR-DGGE

I.10.1. Principe de la PCR-DGGE

Le principe de la DGGE est basé sur la séparation partielle d'un fragment d'ADN double-brin sous l'action d'un dénaturant (Fischer et Lerman, 1983). La DGGE permet de séparer des fragments d'ADN de taille identique mais avec des séquences différentes. La séparation est basée sur la mobilité électrophorétique de l'ADN double brin dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire croissant d'agents dénaturants (urée et formamide). L'électrophorèse est effectuée à une température constante entre 55 et 65°C, la plupart du temps à 60°C. Cependant, si le gradient augmente de façon linéaire, la dénaturation de l'ADN ne se fait pas de façon progressive tout au long de la molécule, mais de domaine en domaine. La séparation des doubles brins se fait plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT (Adénine-Thymine, deux doubles liaisons) et GC (Guanine-Cytosine, trois doubles liaisons). La conformation spatiale du fragment d'ADN se modifie parallèlement à l'importance des domaines dénaturés ce qui limite sa mobilité électrophorétique (Muyzer *et al.*, 1996). Une résolution optimale est obtenue quand les fragments ne sont pas totalement dénaturés. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (très riche en GC) est associée lors de l'amplification (Figure I.13). La PCR est alors réalisée avec l'amorce forward portant en 5' une séquence de 40 GC : le GC clamp (Sheffield *et al.*, 1989).

La mise au point de la technique dépend essentiellement du choix des amorces. Les amorces utilisées pour l'amplification déterminent la finesse et la spécificité de la méthode. Pour les champignons, la cible la plus souvent utilisée pour l'amplification PCR est une des régions très conservée du génome qui inclut également des régions hypervariables (Seifert, 2009). Les amorces sont conçues pour hybrider les régions conservées mais en enjambant des régions variables afin d'obtenir des amplicons de PCR possédant des différences de composition en paires de base qui sont spécifiques des espèces des champignons et peuvent être séparées ensuite par DGGE (Cocolin *et al.*, 2000 ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*,

2008 ; El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c). Les amorces permettent d'amplifier de 100 à 500 pb dans une zone à faible point de fusion (Ercolini *et al.*, 2004). Le « GC clamp » doit être proche de l'extrémité amplifiée ayant le plus fort point de fusion. Il est donc nécessaire de connaître avant l'amplification les zones qui auront une température de fusion plus ou moins élevée. Le comportement du point de fusion des ADN double brins a été décrit par un modèle informatique développé par Lerman *et al.* (1984). Le logiciel informatique est disponible, sous le nom de MacMelt™ (Biorad, Hercules, USA) et il peut calculer le profil de fusion des ADN et montrer les domaines théoriquement élevés et bas en stabilité d'une séquence connue.

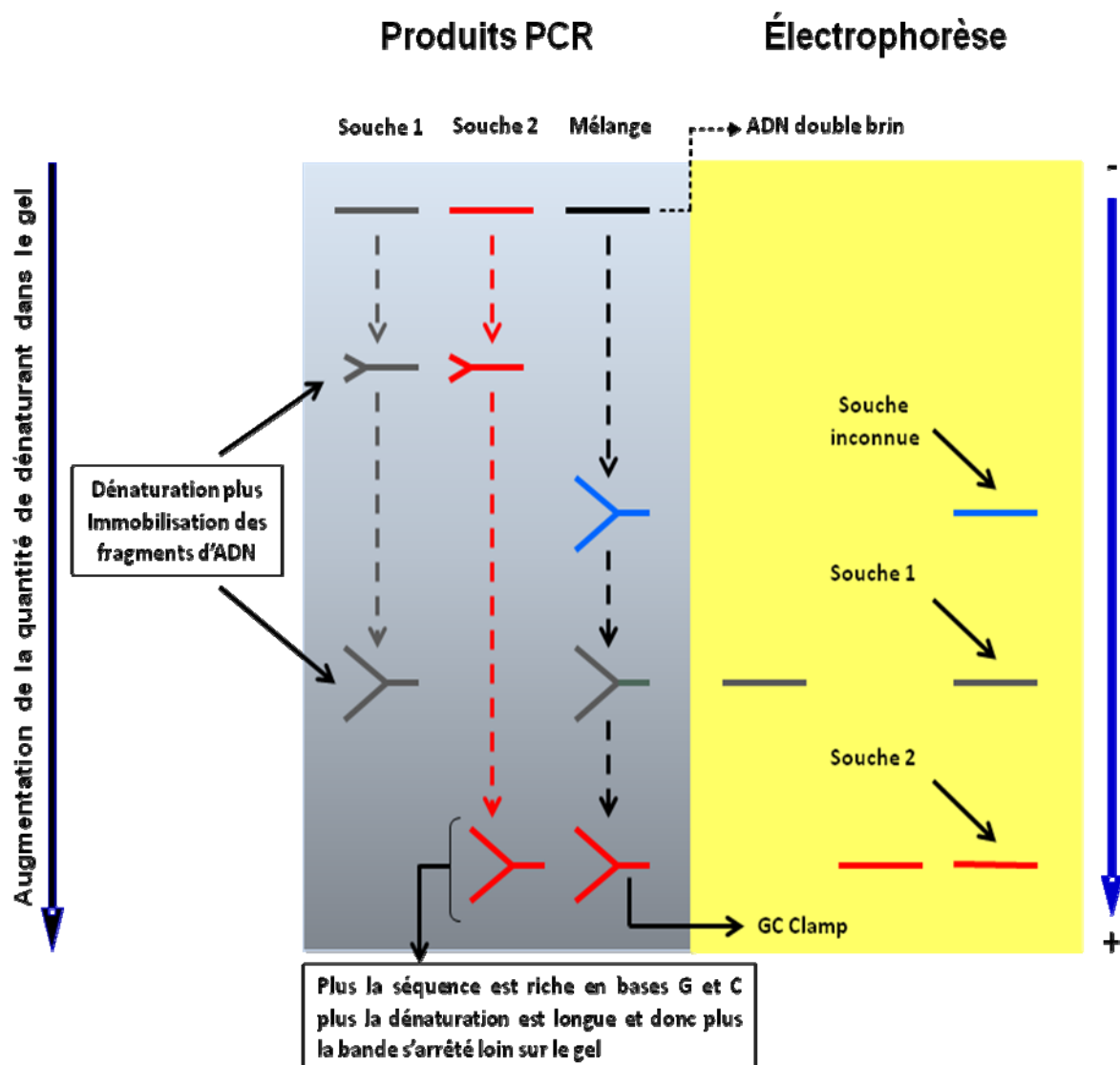


Figure I.13 : Schéma du principe de la DGGE

La technique de PCR-DGGE est un outil moléculaire bien établi en microbiologie de l'environnement qui permet l'étude de la complexité et le comportement des communautés microbiennes. La technique est fiable, reproductible, rapide, peu coûteuse et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en une seule étape. La DGGE est très appliquée à l'étude de la diversité microbienne et de plus peut être couplée à des techniques de clonage et de séquençage ultérieures (Muyzer *et al.*, 1993).

La totalité des microorganismes est tout d'abord extraite de l'échantillon puis les ADN sont extraits des microorganismes en une seule étape pour obtenir un mélange contenant l'ADN total des flores microbiennes présentes dans l'échantillon. Ensuite, l'ADN total est utilisé comme cible d'amplification par PCR des régions d'intérêt. Les produits amplifiés obtenus sont composés d'un mélange des amplicons des flores microbiennes de l'échantillon initial. Tous les amplicons ont la même taille mais leurs séquences sont différentes, par conséquent ils peuvent être séparés par la DGGE (Figure I.14).

Le résultat final est une empreinte génétique spécifique des espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. Le profil électrophorétique présente une série de bandes spécifiques de la population microbienne de l'échantillon analysé dont on considère que chaque bande représente un microorganisme (Muyzer *et al.*, 1993, Ercolini, 2004).

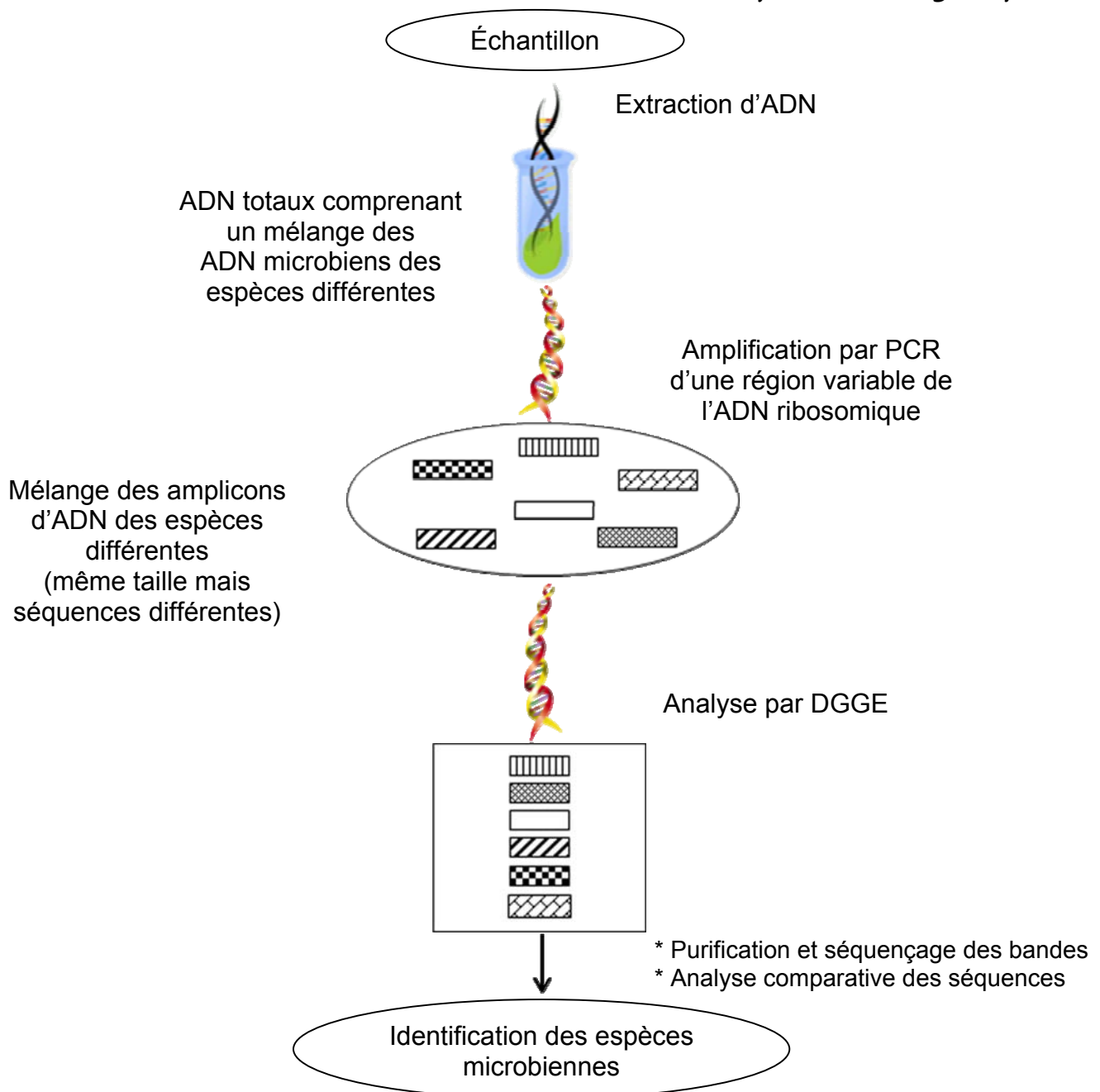


Figure I.14 : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires (Ercolini, 2004)

I.10.2. Les applications de la PCR-DGGE

I.10.2.1. Étude de la biodiversité de la communauté microbienne dans l'environnement

Depuis son introduction par Muyzer *et al.* (1993) en communauté microbienne, la PCR-DGGE a été employée avec succès pour étudier les communautés microbiennes dans l'environnement. Cette technique est habituellement employée pour évaluer la diversité de la communauté et pour

déterminer sa dynamique en réponse aux variations environnementales. Peu d'études ont utilisé cette technique pour caractériser la diversité des eucaryotes. Les plus récentes applications portent sur l'étude de la structure et de l'évolution des communautés des champignons de l'environnement (López-Archilla *et al.*, 2001 ; Aguilera *et al.*, 2006) ; du sol (Van Elsas *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2008) ; de l'aérosol (Nieguitsila *et al.*, 2007) ; des fruits frais (El Sheikha *et al.*, 2009a; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha et Montet, 2010; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c) ; de rhizosphère du blé (Smit *et al.*, 1999 ; Gomes *et al.*, 2003) ; du compost (Marshall *et al.*, 2003) ; des boues (Marsh *et al.*, 1998) ; des picoeucaryotes marins (Díez *et al.*, 2001a,b) ; des rivières (Van Hannen *et al.*, 1999 ; Amaral Zettler *et al.*, 2002) ; du bois (Vainio et Hantula, 2000).

1.10.2.2. Suivi et identification de la communauté microbienne au cours des fermentations

Au cours de ces dernières années, la méthode DGGE a également été utilisée pour étudier les populations de champignons dans le lait, le pain au levain (Meroth *et al.*, 2003. Gatto et Torriani, 2004) (Cocolin *et al.*, 2002a.), dans le café (Masoud *et al.*, 2004) et les fermentations du vin (Cocolin *et al.*, 2000, 2001, 2002b ; Hernán-Gómez *et al.*, 2000 ; Mills *et al.*, 2002 ; Cocolin et Mills, 2003; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Le grand potentiel montré par la PCR-DGGE pour analyser les échantillons environnementaux a stimulé les microbiologistes pour étudier la possibilité de son application dans le suivi des fermentations microbiennes. Parmi les premiers qui s'y sont intéressés, Cocolin *et al.* (2000) et Fernandez-Gonzalez *et al.* (2001) ont étudié la diversité des levures et des moisissures présentes au cours de la fermentation du vin. Ils montrent que la PCR-DGGE est une alternative viable aux méthodes classiques en boîte de pétri pour une évaluation qualitative des constituants microbiens dans les fermentations de vins modèles. La PCR-DGGE est très sensible et permet de détecter des différences subtiles dans le développement des flores de champignons et leur persistance dans deux fermentations réalisées dans des conditions légèrement différentes. Dans chaque cas, les auteurs ont obtenu une excellente corrélation entre les données obtenues en boîte de pétri et la présence ou l'absence d'une bande en DGGE.

La majorité des études de communauté utilisant la PCR-DGGE a conclu que cette technique semble offrir un outil rapide et bon marché par rapport aux méthodes

traditionnelles de microbiologie pour suivre la dynamique des communautés microbiennes au cours de la fermentation et offre de plus la possibilité d'identifier les espèces de microorganismes par séquençage. En outre, la PCR-DGGE a la capacité d'être applicable à un grand nombre d'échantillons en utilisant un volume minimal d'échantillons (Nielsen *et al.*, 2005 ; Nielsen *et al.*, 2007 ; Stringini *et al.*, 2008 ; Laforgue *et al.*, 2009).

De plus, cette approche globale pourrait servir pour le contrôle des appellations d'origine. Coppola *et al.* (2001) ont comparé différents modes de fabrication de fromage : une méthode dite artisanale et une méthode plus industrielle. Ils ont montré que la microflore du fromage dépend en partie du mode de production. De ce fait, la technique de PCR-DGGE pourrait être assimilée à un outil de diagnostic pour les produits qui doivent porter la mention « produit artisanal ».

1.10.2.3. Contrôle de qualité des produits alimentaires

La PCR-DGGE peut être appliquée, en tenant compte de ses limites de sensibilité, à la détermination des flores des champignons dans un produit fini, et ainsi permettre de contrôler sa qualité microbiologique. Ainsi, Cocolin *et al.* (2004) ont utilisé la PCR-DGGE, la RT-PCR-DGGE et l'hybridation pour la surveillance de la détérioration des vins par des champignons et ont proposé de détecter la présence de *Brettanomyces bruxellensis* comme test de confirmation de détérioration des vins.

Nielsen *et al.* (2005) l'ont utilisée pour caractériser les populations levuriennes présentes dans le cacao fermenté Ghanéen sur trois sites différents à des périodes différentes au cours de la saison de production. Ils ont montré que la PCR-DGGE semble être une méthode efficace et relativement bon marché pour examiner la composition microbienne de la fermentation du cacao, offrant ainsi la possibilité d'examiner un certain nombre d'échantillons dans un temps relativement court. En outre, une meilleure compréhension de la dynamique microbienne au cours de la fermentation du cacao est une étape importante vers l'élaboration de mesures de gestion de qualité pour la production de cacao de haute qualité.

Dans la même optique, Laforgue *et al.* (2009) ont ainsi montré que la PCR-DGGE a permis de suivre la dynamique des communautés fongiques présentes sur les raisins pour une détection précoce des espèces potentiellement impliquées dans les défauts du vin. À cette fin, ils ont constitué une collection de référence de levures

et espèces de moisissures isolées à partir de raisins (Sage *et al.*, 2004 ; Serra *et al.*, 2005), incluant les espèces responsables des défauts du vin. Ils ont conclu que la PCR-DGGE représente un outil utile pour établir le profil des communautés fongiques, mais ne convient pas directement pour décrire avec précision les espèces présentes. Des études complémentaires devront ainsi être réalisées sur les cultures complexes pour une meilleure connaissance des communautés fongiques sur les raisins, en particulier des espèces responsables des défauts du vin. Lorsque ces espèces seront connues, il sera également intéressant de concevoir des méthodes plus spécifiques pour les détecter.

1.10.3. Les limites de la PCR-DGGE

Comme toutes les techniques moléculaires, la PCR-DGGE est elle aussi soumise à de nombreux biais qui peuvent forcément entacher l'analyse de la diversité microbienne d'un échantillon. Ces biais peuvent intervenir à différents stades de l'analyse : lors de l'échantillonnage, de la conservation de l'échantillon, de la lyse cellulaire lors de l'extraction des ADN, de l'amplification de l'ADNr 26S/28S par PCR, de la migration électrophorétique sur le gel DGGE et du manque de sensibilité de la méthode pour les souches présentes en faible quantité.

1.10.3.1. Echantillonnage et conservation des échantillons

L'échantillon prélevé dans le milieu devra rendre compte le plus fidèlement possible de l'ensemble des espèces présentes dans l'environnement. Il est donc important de connaître les conditions physico-chimiques d'obtention des échantillons.

Dans le cas où il n'est pas possible de traiter (extraction d'ADN) l'échantillon dès son prélèvement, il est nécessaire de le stocker dans les conditions qui permettent de conserver l'intégrité des acides nucléiques. En effet, le lavage, le transport ou les procédures de refroidissement peuvent influencer les espèces microbiennes présentes dans l'échantillon en augmentant ou en réduisant le nombre et les espèces pouvant être détectées par la PCR-DGGE (Ercolini, 2004).

1.10.3.2. Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN constitue une étape clé. La première étape de l'extraction est la lyse cellulaire, qui a pour effet de casser les membranes cellulaires des microorganismes en endommageant le moins possible les acides nucléiques.

L'efficacité de la technique de lyse cellulaire sur un échantillon est d'autant plus difficile à déterminer que l'on ne connaît pas le type et la quantité de cellules microbiennes à analyser. Toutes les espèces microbiennes n'ont pas la même sensibilité aux agents lytiques du fait des compositions différentes de leur paroi. La paroi cellulaire de champignons responsable de la forme est riche en cellulose ou en chitine selon les groupes. Elle contient également en proportions variables des polysaccharides, des substances pectiques, des protéines, des pigments, de l'hémicellulose, etc (Guiraud, 2003). La paroi cellulaire des eucaryotes est très complexe, plus rigide et plus résistante à lyser que celle des procaryotes (Zinser et Daum, 1995 ; Müller *et al.*, 1998 ; Karakousis *et al.*, 2006 ; Tortora, 2010).

La purification des acides nucléiques peut s'avérer difficile sur des échantillons non homogènes. Les matrices alimentaires contenant des lipides, protéines, polysaccharides et sels diminuent les rendements d'extraction et peuvent être retrouvées dans les extraits d'ADN. Ces résidus pourraient également agir comme inhibiteurs lors de l'amplification par PCR. Il est aussi parfois nécessaire de simplifier la technique d'extraction afin d'avoir des ADN de meilleure qualité (Wilson, 1997).

1.10.3.3. Amplification par PCR

L'amplification par PCR est l'une des sources majeures de biais dans l'étude de la diversité microbienne. Certains brins subissent une amplification préférentielle par PCR (Reysenbach *et al.*, 1992). Cette amplification préférentielle pourrait être provoquée par la réhybridation d'ADN cibles, ce qui empêche l'hybridation des amorces (Suzuki et Giovannoni, 1996). Elle peut être aussi liée au choix des amorces (Brunk et Eis, 1998), à la composition en G+C de la séquence (Dutton *et al.*, 1993) et aux séquences adjacentes de la zone à amplifier (Hansen *et al.*, 1998).

Un mélange d'ADN microbien d'une communauté peut ainsi n'être que partiellement amplifié par PCR, avec pour conséquence l'obtention d'un produit dont une partie des membres originaux de la communauté est absente. Cela représente un problème pour l'analyse de la communauté microbienne par la PCR-DGGE parce que le nombre d'espèces détectées peut ne pas refléter complètement la diversité de l'échantillon.

Le choix des amorces et la région cible pour l'amplification est aussi important. Pour un même échantillon, l'image de la population microbienne peut varier en fonction de la région variable de l'ADN 18S/26S amplifiée (Ercolini, 2004).

Un autre problème est la formation de molécules hétéroduplex au cours de l'amplification, ce qui peut rendre difficile l'interprétation de la diversité microbienne par DGGE (Ruano et Kidd, 1992). Une molécule d'ADN hétéroduplex a deux brins de 2 produits PCR différents, qui peuvent être formés par la réhybridation des produits dénaturés de PCR. En raison des mésappariements entre le double brin dans les molécules hétéroduplex, leur température de fusion est plus basse que celle des molécules homoduplex.

La présence de l'ADN de contaminants dans le tampon de réaction, de l'eau ou les tubes peut aussi fausser le résultat de l'amplification en augmentant la diversité de l'échantillon (Tanner *et al.*, 1998).

1.10.3.4. La DGGE

Une des limitations de la DGGE est le gel d'acrylamide qui ne permet qu'une séparation des fragments ayant une longueur maximale de 500 paires de base (Myers *et al.*, 1985). Une identification fiable des espèces microbiennes est difficile car les séquences des bandes de DGGE que l'on compare à celles des bases de données peuvent être identiques au sein du même genre des champignons d'autant plus que les séquences comparées sont petites. De plus, il n'est pas toujours possible de séparer les fragments d'ADN qui ont certaines variations dans les séquences (Vallaeys *et al.*, 1997).

La co-migration des fragments d'ADN peut être un problème pour la recherche des séquences particulières. En fait, malgré des séquences différentes, les propriétés de fusion des brins d'ADN peuvent être quelquefois identiques. Dans ce cas, les gels DGGE ne peuvent permettre la séparation des bandes (Ercolini, 2004).

1.10.3.5. Limite de la détection des champignons

La sensibilité de la PCR-DGGE est basée sur la réaction de la PCR et sa capacité d'amplifier l'ADN des champignons d'un échantillon complexe. Pour obtenir les meilleurs résultats, le produit doit être autant pur et concentré que possible. Généralement, la sensibilité pour un échantillon alimentaire est réduite, due à un

éventail de substances inhibitrices (Wilson, 1997). Plus problématique, le seuil de détection par PCR-DGGE des espèces est l'objet de controverses. Certains auteurs estiment qu'il dépend du niveau des populations. Pour Cocolin *et al.* (2000), une population minimum de 10^4 cellules/mL est nécessaire pour rendre détectable l'espèce considérée. D'autres auteurs avancent que le seuil de détection d'une espèce est fonction du rapport entre les concentrations de chaque espèce. Ainsi Prakitchaiwattana *et al.* (2004) avancent qu'un rapport de concentrations excédant 1 pour 1000 entre plusieurs espèces limite la détection aux espèces majoritaires uniquement. De tels rapports biaisent l'étape de PCR. En effet lors de la PCR, la probabilité d'amplification d'une séquence est d'autant plus forte que sa concentration initiale est élevée. Les matrices majoritaires sont forcément aussi les plus amplifiées. Sous la loi exponentielle qui régit l'amplification par PCR, des rapports initiaux de populations mêmes relativement faibles entraînent nécessairement des rapports importants entre les produits PCR de sorte que seuls les produits majoritaires sont détectés sur le gel d'acrylamide. En fait, il est probable que le seuil de détection d'une espèce au sein d'un mélange résulte de la combinaison du niveau de la population totale, du nombre d'espèces présentes et de sa concentration spécifique au sein du mélange. Mais dans tous les cas, il est important de souligner que l'absence de détection sur gel DGGE d'une espèce après l'analyse directe ne signifie pas nécessairement son absence dans l'échantillon.

Bien que la méthode de PCR-DGGE soit souvent employée, il y a encore quelques inconvénients qui peuvent réduire son efficacité pour analyser les communautés de champignons. Malgré ces limites, la DGGE est fortement préférée et considérée comme une des meilleures techniques permettant le suivi de la communauté de champignons d'un aliment de façon globale, rapide et reproductible (El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c).

RapportGratuit.com

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Les matériels biologiques

II.1.1. Les souches utilisées dans cette étude

Les souches de levures, moisissures et bactéries utilisées dans cette étude sont énumérées dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Souches de levures, moisissures et bactéries utilisées dans cette étude

Espèces	Souches	Origine
Levures		
<i>Candida valida</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Torulopsis glabrata</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Debaromyces varriyi</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Pichia sorbitophila</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Candida parapsilosis</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Hanseniaspora valiensis</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EC 1118	Société Lallemmand
<i>Saccharomyces uvarum</i>	S6 U	Société Lallemmand
<i>Komagataella pastoris</i>	ATCC 28484	ATCC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VL3	Société Lallemmand
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		UMR1083 INRA Montpellier
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1200	CBS*
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10239	ATCC**
Moisissures		
<i>Penicillium roqueforti</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Cladosporium musae</i>	CMR55	UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Cladosporium musae</i>	C62	UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus tubigensis</i>	CBS 161.79	CBS
<i>Fusarium oxysporum</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Mucor racemosus</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus ochraceus</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus carbonarius</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus bombycis</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus nomius</i>	SLV 549	Administration suédoise alimentaire nationale (NFA)
<i>Aspergillus nomius</i>	SLV 550	Administration suédoise alimentaire nationale (NFA)
<i>Aspergillus niger</i>	CET 2091	UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Trichoderma harzianum</i>	CBS 819. 68	CBS
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Fusarium solani</i>		Unité de microbiologie, Centre national de recherches du Caire
Bactéries		
<i>Bacillus subtilis</i>		Unité de microbiologie, Centre national de recherches du Caire
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43695	ATCC

* CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

** ATCC : American Type Culture Collection

II.1.2. Échantillonnage des fruits de Karité et de Physalis

Les fruits mûrs de l'arbre de Karité *Vitellaria paradoxa* ont été prélevés dans différents districts de trois pays : Mali, Sénégal et Cameroun. Les fruits mûrs de *Physalis* *Physalis ixocarpa* Brot, *Physalis pruinosa* L, *Physalis pubescens* L et *Physalis peruviana* L ont été prélevés dans districts différents de trois pays : Égypte, Ouganda et Colombie. Ils ont été recueillis directement sur l'arbre en utilisant des gants et mis dans des sacs stériles en juillet 2008 pour le Karité et de mars à juin pour le *Physalis*. Ces sacs ont été conservés dans un réfrigérateur, puis transférés par avion au CIRAD de Montpellier (France) où les ADN de levures et de moisissures ont été extraits immédiatement à partir des fruits frais. Les échantillons ont été conservés dans une chambre froide à -20°C durant toute la durée de l'expérimentation. L'origine des échantillons a été définie par pays, lieu et date de récolte.

II.1.2.1. Échantillonnage du Karité au Mali

Les fruits mûrs de l'arbre de Karité *Vitellaria paradoxa* ont été prélevés dans cinq districts différents du Mali. Le tableau II.2 et la figure II.1 donnent les coordonnées géographiques des lieux de récoltes (fruits intacts de Karité) au Mali.

Tableau II.2 : Cordonnées géographiques des lieux de récolte des fruits de Karité au Mali

Pays	Régions	Sites	Coordonnées GPS	
			Longitude	Latitude
Mali	Sikasso	Nafégué	10° 29' 31.68" N	5° 58' 17.16" O
	Ségou	Daelan	13° 15' 06.96" N	4° 59' 16.74" O
	Mopti	Tori	13° 37' 00.00" N	3° 43' 00.00" O
		Sassambourou	14° 18' 00.00" N	3° 28' 48.00" O



Figure II.1 : Localisation des sites d'échantillonnage du Karité au Mali
(http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7)

Les conditions climatiques

Sikasso : Le climat est de type tropical soudanien, subdivisé en deux ensembles climatiques : la zone soudanienne humide et la zone guinéenne qui est la région la plus humide du Mali et la plus arrosée (700 à 1 500 mm/an). La température moyenne annuelle est de 27°C.

Ségou : Elle est essentiellement située dans la zone sahélienne où elle bénéficie d'un climat semi-aride (moyenne des précipitations annuelles : 513 mm). La présence de plusieurs cours d'eau permet les cultures irriguées. Elle est en effet traversée par le fleuve Niger sur 292 km ainsi que par la rivière Bani.

Mopti : Mopti appartient à la frange centrale du Sahel africain, dite « Le Sahel des nomades ». De ce fait elle bénéficie d'un climat semi-aride avec un total des précipitations annuelles de 467 mm et une saison des pluies s'étendant de fin mai à début octobre. Le mois d'août est le plus arrosé avec un total des précipitations de 156 mm. Les températures connaissent aussi des variations saisonnières non négligeables. Les températures les plus chaudes sont enregistrées au mois de mai ($T_{\max} = 40.6^{\circ}\text{C}$) et les plus froides en janvier ($T_{\min} = 15.0^{\circ}\text{C}$). Ces conditions climatiques sont associées à une végétation clairsemée de steppe et l'élevage itinérant constitue la principale ressource agricole.

II.1.2.2. Échantillonnage du Karité au Sénégal

Les fruits mûrs de l'arbre de Karité *Vitellaria paradoxa* ont été prélevés dans trois districts différents du Sénégal. Le tableau II.3 et la figure II.2 donnent les coordonnées géographiques des sites de récoltes au Sénégal.

Tableau II.3 : Cordonnées géographiques des lieux de récolte des fruits de Karité au Sénégal

Pays	Régions	Sites	Coordonnées GPS	
			Longitude	Latitude
Sénégal	Tambacounda	Saraya	12° 49' 53.62" N	11° 45' 21.10" O
		Samécouta	12° 36' 10.00" N	12° 07' 80.13" O
		Kenloto	12° 34' 20.11" N	12° 09' 60.16" O



Figure II.2. : Localisation des sites d'échantillonnage du Karité au Sénégal
(http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7)

Les conditions climatiques

Au Sénégal, il existe 5 types de domaines climatiques appartenant au climat tropical.

Tambacounda : La région de Tambacounda est incluse dans la zone au climat soudano-guinéen, les forêts sont très présentes ainsi que de grandes savanes très denses. Les arbres sont variés : baobab, fromager, palmier, filao et ronier. Le mois d'août est le plus arrosé avec un total des précipitations de 308 mm. Les

températures connaissent aussi des variations saisonnières non négligeables. On enregistre les températures les plus chaudes au mois d'avril ($T_{\max} = 40^{\circ}\text{C}$) et les plus froides en janvier ($T_{\min} = 18^{\circ}\text{C}$).

II.1.2.3. Échantillonnage du Karité au Cameroun

Les fruits mûrs de l'arbre de Karité *Vitellaria paradoxa* ont été prélevés dans le district d'Adamaoua au Cameroun. Le Tableau II.4 et la Figure II.3 donnent les coordonnées géographiques du site de récolte.

Tableau II.4. : Cordonnées géographiques du site de récolte des fruits de Karité au Cameroun

Pays	Région	Site	Coordonnées GPS	
			Longitude	Latitude
Cameroun	Adamaoua	Mbe	7° 53' 12.05" N	13° 35' 04.56" E

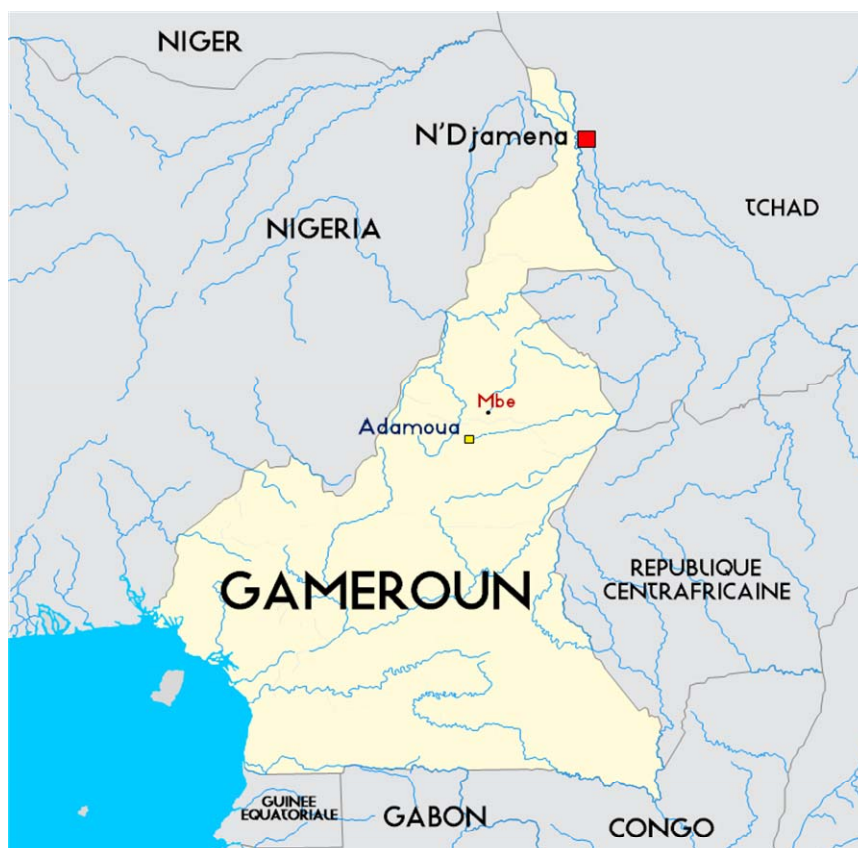


Figure II.3 : Localisation du site d'échantillonnage du Karité au Cameroun
(http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7)

Les conditions climatiques

L'altitude élevée de la région d'**Adamaoua** donne un climat relativement frais compris entre 22 et 25°C. Dans le sud de la région, c'est un climat équatorial de type guinéen avec quatre saisons : une longue saison sèche de décembre à mai, une petite saison humide de mai à juin, une petite saison sèche de juillet à octobre, et une longue saison des pluies d'octobre à novembre. Sur les plateaux d'Adamaoua, le climat est de type tropical soudanien. Il y a seulement deux saisons : la période sèche va de novembre à avril puis vient la saison humide. Les précipitations moyennes annuelles sont de 900 mm à 1 500 mm et diminuent davantage au nord. Le troisième type de climat au sud-ouest de l'Adamaoua (département du Mayo-Banyo) est un climat équatorial de type camerounais. Les précipitations vont de 1500 mm à 2000 mm par avec une longue saison sèche suivie d'une longue saison des pluies.

II.1.2.4. Échantillonnage du Physalis en Egypte

Les fruits mûrs de *Physalis* ont été recueillis dans un domaine particulier dans quatre districts du Delta du Nord et Moyen Nil en Égypte, à savoir, Arabe El-Rawshda, El-Sadate, Moderyet El Tahrir et Borg El-Arabe. Ces districts dépendent de quatre gouvernements: Qalyoubia (*Physalis ixocarpa* Brot), Minufiya (*Physalis pubescens* L), Beheira et à Alexandrie (*Physalis pruinosa* L) respectivement. Le Tableau II.5 et la Figure II.4 donnent les coordonnées géographiques des sites de récoltes en Égypte.

Tableau II.5 : Cordonnées géographiques des lieux de récolte des fruits de *Physalis* en Égypte

Pays	Régions	Sites	Coordonnées GPS	
			Longitude	Latitude
Égypte	Minufiya	El Sadat	30° 24' 49.84" N	30° 34' 26.25" E
	Alexandrie	Borg El Arabe	30° 55' 02.25" N	29° 32' 07.08" E
	Qualyoubia	Arabe El Rawashda	30° 21' 14.40" N	31° 11' 51.36" E
	Beheira	Moderyet El Tahrir	31° 09' 20.79" N	29° 51' 51.09" E



Figure II.4 : Localisation des sites d'échantillonnage du *Physalis* en Égypte
(http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7)

Les conditions climatiques

Minufiya et Qalyoubia : Les gouvernements de Minufiya et de Qalyoubia ont un climat semi-désertique, qui est caractérisé par une pluviométrie faible, une température élevée et un sol sableux.

Alexandrie et Beheira : Les gouvernements de Beheira et d'Alexandrie ont un climat méditerranéen, qui se caractérise par des précipitations abondantes, de basses températures et un sol argileux.

*II.1.2.5. Échantillonnage du *Physalis* en Ouganda*

Les fruits mûrs de *Physalis* de l'espèce *Physalis peruviana* L. ont été recueillis dans les domaines de Kawempe et Mukono, région Centrale de l'Ouganda. Le tableau II.6 et la Figure II.5 donnent les coordonnées géographiques des sites de récoltes en Ouganda.

Tableau II.6 : Cordonnées géographiques du lieu de récolte des fruits de Physalis en Ouganda

Pays	Région	Site	Coordonnées GPS	
			Longitude	Latitude
Ouganda	Centrale	Kawempe	0° 22' 45.00" N	32° 33' 27.00" E
		Mukono	0° 21' 12.00" N	32° 45' 19.00" E



Figure II.5 : Localisation des sites d'échantillonnage du Physalis en Ouganda
(http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7)

Les conditions climatiques

Centrale : La région de Centrale a un climat équatorial ensoleillé, tempéré par l'altitude relativement élevée comme la plupart des régions du pays. La partie sud de la région sud a deux saisons des pluies, qui commencent généralement début avril et de nouveau en Octobre, et un peu de pluie en juin et décembre. Les régions sud-est et sud-ouest reçoivent plus de 1500 mm de précipitations annuelles.

II.1.2.6. Échantillonnage du *Physalis* en Colombie

Les fruits mûrs de *Physalis* de l'espèce *Physalis peruviana* L. ont été recueillis dans le district de Cota Cundinamarca district, région de Sabana et le district d'Usaquén, région de Bogotá en Colombie. Le tableau II.7 et la figure II.6 donnent les coordonnées géographiques des sites de récoltes.

Tableau II.7.: Cordonnées géographiques du lieu de récolte des fruits de *Physalis* en Colombie

Pays	Région	Site	Coordonnées GPS	
			Longitude	Latitude
Colombie	Bogota	Usaquén	4° 42' 12.06" N	74° 02' 03.16" O
	Sabana	Cota Cundinamarca	4° 48' 34.44" N	74° 05' 53.26" O



Figure II.6 : Localisation des sites d'échantillonnage du *Physalis* en Colombie
(http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7)

Les conditions climatiques

Usaquén : Le site d'Usaquén, région de Bogota en Colombie a un climat des hautes terres subtropicales qui se caractérise par de fortes précipitations. Les mois d'Avril à novembre sont les plus pluvieux, la température est douce et le mois de janvier est le plus chaud avec 25°C. L'altitude est de 2640 m. Mais les conditions climatiques de cette région sont irrégulières et très variables en raison des phénomènes climatiques d'El Niño et La Niña.

Cota Cundinamarca : Le site de Cota Cundinamarca a le même climat froid que la région Sabana (principalement touchée par l'altitude) qui se situe généralement entre 5 et 14°C, avec une température moyenne de 13,5°C. Les jours de pluie de l'année sont d'avril à mai et entre Septembre et Décembre, atteignant 110 mm/mois; la saison la plus sèche de l'année est entre Janvier et Février et entre Juillet et août, au cours desquelles on assiste à des changements brusques de température la nuit et tôt le matin.

II.2. Analyses physico-chimiques et chimiques du jus de *Physalis (Physalis pubescens L)*

Le rendement en jus est le pourcentage de jus obtenu à partir de 100 g de fruits frais (Omar, 1998). La couleur des échantillons du jus brut est évaluée en utilisant un Tintometer Lovibond (modèle E. Salisbury, Grande-Bretagne) (Ranganna, 1979). L'humidité est déterminée à l'étuve à 104°C, les protéines brutes (% N \times 6,25) sont quantifiées par micro Kjeldahl et les cendres totales sont déterminées par carbonisation au four à 500°C (Anon, 1995). Le pH est mesuré à 25°C. L'acidité totale est obtenue par titration avec de la NaOH 0,1 N en utilisant de la phénolphthaléine comme indicateur, puis l'acidité totale est exprimée en acide citrique anhydre par 100 g d'échantillon. L'acide ascorbique a été estimé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu à 760 nm (Bajaj et Kaur, 1981). Les substances polyphénoliques totales sont mesurées par colorimétrie (en équivalent acide tannique) à 640 nm par la méthode de Folin-Ciocalteu (Dóka et Bicanic, 2002). La teneur totale en caroténoïde est déterminée par solubilisation de l'extrait à 80% dans l'acétone et mesurée par spectrophotométrie à 440 nm ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Anon, 1995). La teneur en substance pectique est déterminée par une méthode spectrophotométrique après extraction fractionnée des solides insolubles dans l'alcool selon la méthode décrite par Egan *et al.* (1981). Treize minéraux importants

ont été analysés. Le phosphore total est déterminé par colorimétrie à 660 nm (Tausky et Shorr, 1953) et la teneur en sodium et en potassium est estimée par photomètre de flamme (Jenway PFP 7, GB). D'autres minéraux ont été déterminés par spectrophotométrie atomique (Perkin Elmer 932AA, Australie). Le ratio [sucre/acide] est calculé en utilisant la formule : total des solides solubles/acidité titrable (Fuleki *et al.*, 1995). La mesure du degré Brix est réalisée en utilisant un réfractomètre Abbe à 20°C, gradué en% (Carl Zeiss, Allemagne).

II.2.1. Teneur totale en sucres

II.3.1.1. Extraction des sucres au reflux de l'éthanol à 80% (Anon, 2000)

Cinq g d'échantillon sont agités dans 100 mL d'éthanol 80% avant d'être maintenus au reflux de l'éthanol pendant 1 h. Le résidu insoluble est réintroduit dans 100 mL d'éthanol 80% et l'extraction est effectuée une seconde fois pendant 1 h. Le résidu insoluble est rincé à l'éthanol 80%. L'éthanol est ensuite éliminé à 45°C grâce à un évaporateur rotatif jusqu'à obtenir 15 à 20 mL d'extrait. On ajuste ensuite à 50 mL avec de l'eau pure puis on filtre à 0,2 mm pour l'analyse chromatographique.

II.2.1.2. Dosage des mono et disaccharides par chromatographie ionique (Anon, 2001)

Le jus brut de *Physalis* est dilué pour obtenir une concentration de chaque sucre comprise entre 5 et 30 mg·L⁻¹. Une quantité de 0,8 mL de la solution filtrée ou centrifugée est versée dans un tube adapté à la machine de prélèvement automatique. La séparation a été réalisée grâce à un chromatographe ionique (Dionex DX600) équipé d'une colonne échangeuse d'anions remplie de billes de polystyrène-divinyl-benzène de 5-10 µm (Dionex CarboPac PA1; 250 mm × 4 mm) et d'un détecteur ampérométrique (PAD).

II.2.2. Fractionnement des polyphénols par HPLC

Les polyphénols extraits du jus brut sont fractionnés par HPLC (HP 1100, Allemagne) en utilisant les conditions suivantes : volume d'injection 10 µL ; colonne Hypersil BDS-C18, 5 µm (150 mm 4,6 mm, Altech, USA), détecteur UV à 254 nm, phase mobile : solvant A : acide acétique/acétonitrile 0,5/99,5, v/v et solvant B : acide acétique/eau distillée 0,5/99,5, v/v avec un débit de 0,3 mL·min⁻¹ à 25°C. La courbe standard est préparée en mélangeant des poids égaux d'acide pyrogallique,

hydroquinone, résorcinol, catéchine, phénol, rutine, myricétine, quercétine, kaempférol, acide gallique, acide protocatéchique, acide parahydroxybenzoïque, acide chlorogénique, acide vanillique, acide paracoumarique, acide férulique, acide salicylique, acide ortho-coumarique, acide coumarique et acides cinnamiques.

II.2.3. Analyse des acides aminés

La composition en acides aminés est déterminée grâce à un analyseur d'acides aminés Beckman 119 CL (GB) (Moore, 1963) après hydrolyse à l'HCl 6 N contenant du mercaptoéthanol 0,1% à 100°C pendant 24 h. Le tryptophane est quantifié sur une Ba(OH)₂ hydrolysats par la méthode colorimétrique de Miller (1967).

II.2.4. Détermination de la teneur en huile des jus

Vingt g de jus de Physalis brut sont versés dans une ampoule à décanter de 1L et agités avec 100 mL d'hexane. La phase inférieure aqueuse est récupérée puis re-extraite avec de l'hexane à trois reprises. Les phases hexaniques sont recueillies et lavées avec de l'eau distillée trois fois. La phase hexanique totale est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Après distillation de l'hexane et élimination des dernières traces sous flux d'azote, la teneur en lipides totaux est obtenue par pesée.

II.2.5. Composition en acides gras et calcul de l'indice d'iode

II.3.5.1. Préparation des esters méthyliques d'acides gras (FAME)

Les triacylglycérols sont méthylés directement en esters méthyliques. Dans un flacon de 25 mL à fond rond, 10 mg d'huile extraite sont ajoutés à 3 mL d'une solution de méthylate de sodium contenant de la phénolphthaléine (Anon, 2005). Le mélange réactionnel est chauffé au reflux pendant 10 min et 3 mL de HCl méthanolique sont ensuite ajoutés jusqu'à ce que la phénolphthaléine se décolore. Le mélange est ensuite porté à reflux pendant 10 min et refroidi à température ambiante. De l'hexane (8 mL) et 10 mL d'eau sont ajoutés. La phase organique est récupérée, séchée sur sulfate de sodium anhydre et filtrée pour l'analyse ultérieure en GC.

II.2.5.2. Analyse des esters méthyliques d'acides gras FAME

L'analyse des FAME est réalisée par GC (Agilent, modèle GC 6890) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Une colonne capillaire Supelcowax 10

(SGE, Courtaboeuf, France; 0,32 mm de diamètre intérieur × 30 m de long, épaisseur du film 0,25 µm) est utilisée. Les FAME sont directement injectés dans la GC. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 mL·min⁻¹ et la fuite de 1/100. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur FID de 270°C. Les acides gras sont identifiés par comparaison avec des standards d'acides gras disponibles.

L'indice d'iode est calculé à partir de la teneur en acides gras insaturés de l'huile déterminée par CPG.

II.3. Analyse sensorielle du jus de *Physalis pubescens* L

Les attributs sensoriels (couleur, goût, texture, odeur, homogénéité, aspect général et acceptabilité globale) ont été évalués en utilisant une échelle de 10 points hédoniques (où 9-10 = excellent ; 7-8 = très bonne ; 5-6 = bon ; 4 = moyen ; 2-3 = pauvres et inacceptables) par 20 participants (12 femmes, 8 hommes, groupe d'âge : 25-40 ans) choisis parmi les populations locales et le personnel enseignant de plusieurs ministères liés à l'horticulture qui ont l'habitude de consommer du jus de fruits et des produits d'autres fruits. Les échantillons ont été servis dans des gobelets en polypropylène transparent, qui avaient été identifiés par un nombre à 3 chiffres au hasard. Les questionnaires et de l'eau pour rincer la bouche entre chaque dégustation ont été fournis. Avant l'évaluation, une session a été organisée pour familiariser les membres du panel avec le produit. Les panélistes ont été invités à lire les questionnaires, et la signification de chaque attribut (couleur, goût, texture, odeur, homogénéité, aspect général et acceptabilité globale) a été expliquée à fin d'éviter toute interprétation erronée (Meilgaard *et al.*, 1999 ; Kilcast et Subramanian, 2000). Les dégustateurs n'étaient pas autorisés à discuter de leurs résultats entre eux au cours de la session d'évaluation. L'évaluation a été réalisée selon la méthode de Ranganna (1979).

II.4. Analyse des activités biologiques d'extraits de *Physalis*

II.4.1. Aactivité antimicrobienne

Bacillus subtilis, *Fusarium solani*, *Escherichia coli* O157: H7 ATCC 43695 et *Candida albicans* ATCC 10239 ont été fournis par l'unité de microbiologie du Centre national de recherche, Le Caire, Égypte.

La méthode de diffusion sur disques a été utilisée pour la détermination des activités antimicrobiennes des extraits méthanoliques des polyphénols obtenus à partir de jus brut (Cowan, 1999 ; Cavanagh *et al.*, 2001). Les extraits polyphénoliques sont dilués dans du méthanol à 95% pour obtenir des concentrations à 15 et 30% (p/v). Les micro-organismes sont inoculés à la surface des boîtes Petri Muller-Hinton agar et les disques de papier (6 mm, Whatman n° 1), imprégnés des substances d'essai, sont placés au centre de la boîte de Pétri inoculée. L'effet inhibiteur du méthanol à 95% seul a également été testé en plaçant un disque saturé sur chaque boîte de Petriensemencée. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour les levures et moisissures. Les zones d'inhibition sont calculées en mesurant le diamètre en mm (y compris du disque). Tous les tests ont été effectués en triple exemplaire.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Etude de la communauté microbienne avec la PCR-DGGE

La méthode PCR-DGGE appliquée à l'étude de la communauté microbienne suit un schéma commun qui peut-être divisé en trois étapes. Chacune des étapes doit être la plus performante possible afin d'assurer le meilleur seuil de détection des ADN.

La méthode débute par une extraction des microorganismes à partir de l'aliment. Cette étape est suivie par une extraction de l'ADN total. Cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionnent les étapes qui constituent la suite de l'analyse (Figure III.1).

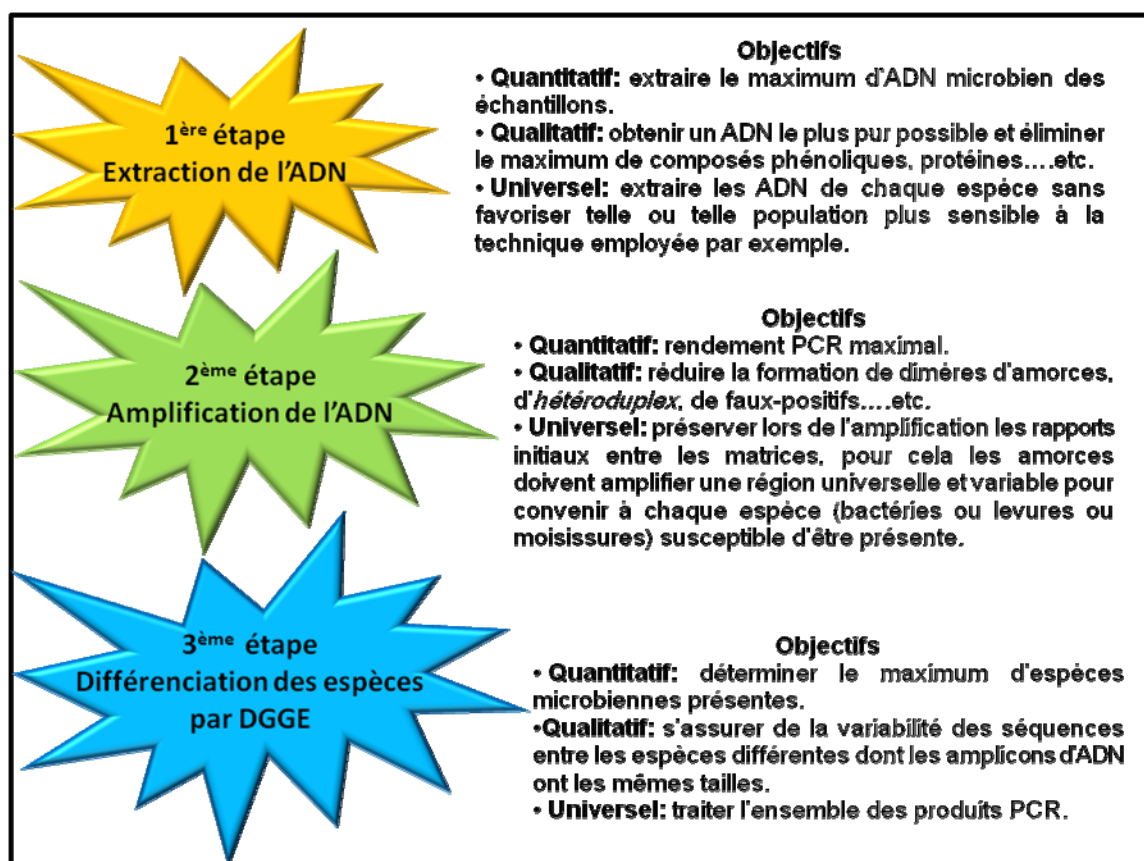


Figure III.1 : Les trois principales étapes d'étude de la communauté microbienne par PCR-DGGE

III.1.1. Mise au point du protocole universel d'extraction de l'ADN microbien

L'hypothèse de départ de ce projet était de relier les communautés microbiennes à l'origine géographique des fruits par l'analyse de la totalité des flores microbiennes présentes sur les fruits en une seule étape d'analyse afin d'établir un code barre biologique permettant de déterminer l'origine géographique des fruits importés. A ce jour, pas une seule méthode d'extraction d'ADN n'est signalée et appropriée pour l'extraction efficace de l'ADN de toutes les espèces microbiennes en une seule étape. La première phase de ce projet a été consacrée à la mise au point de cette innovante technique de biologie moléculaire qui incluait l'extraction de l'ADN, la PCR et la DGGE pour l'analyse de toutes les flores microbiennes (bactéries, levures, moisissures). L'originalité de cette méthode est qu'elle est basée sur l'extraction en une seule étape des ADN totaux des flores microbiennes (bactéries, levures ou moisissures) ainsi que celui des fruits et de la caractérisation de leur ADN. Cette technique appliquée aux levures et aux moisissures n'a jamais été publiée par d'autres équipes.

Pourquoi les levures et les moisissures ?

Les champignons peuvent résister à des conditions plus extrêmes que les bactéries (Ros Chumillas *et al.*, 2007) et ont un plus faible taux de mutation par rapport aux bactéries et aux virus (Drake *et al.*, 1998). Les champignons sont donc des marqueurs environnementaux potentiellement meilleurs que les bactéries.

En effet, les parois des champignons sont composées essentiellement de glucanes dans une conformation en triple hélices. Ces chaînes complexes sont associées avec d'autres polymères pariétaux (liaison covalente avec la chitine et les galactomananes) pour constituer la rigidité des parois des champignons (Figure III. 2). Les glucanes représentent 60% à 70% du poids sec des parois des moisissures et des levures (Bex et Squinazi, 2006 ; Eicher *et al.*, 2010).

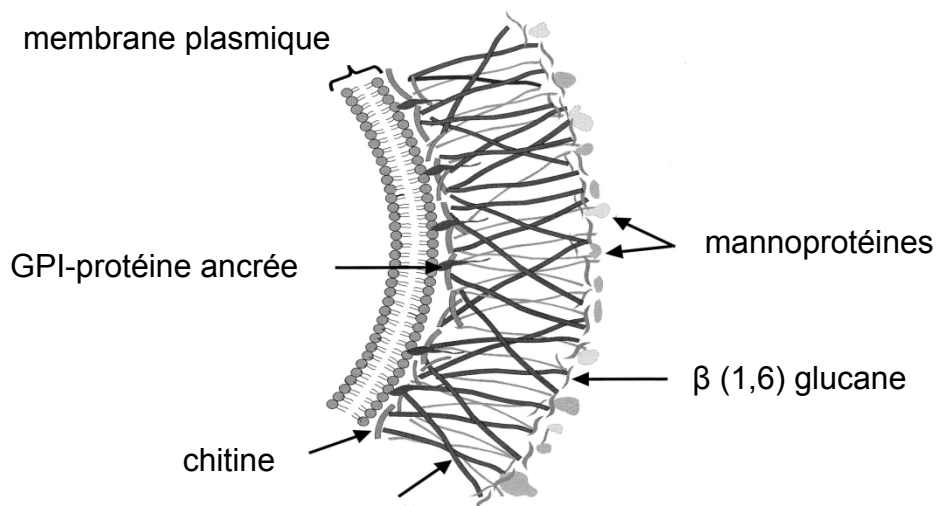
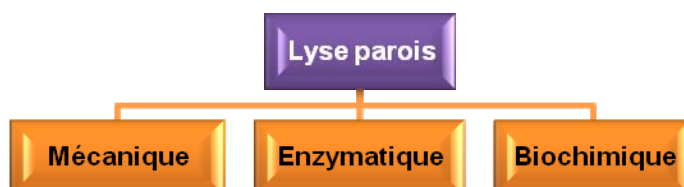


Figure 1 : la paroi cellulaire des champignons

Il existe déjà de nombreux protocoles d'extraction de l'ADN des levures et des moisissures (Ros Chumillas *et al.*, 2007 ; Karakousis *et al.*, 2006) qui permettent d'extraire l'ADN grâce à des kits de purification. Nous avons testé l'utilisation de l'azote liquide pour briser la paroi cellulaire des champignons dans le but de faciliter l'extraction de l'ADN par les enzymes et réactifs biochimiques. Cette méthode est très puissante, mais nous avons voulu développer un peu coûteux et d'une méthode d'extraction de domaine applicable pour les équipes africaines. Pour éviter les parties défavorables de ce protocole (cher, dangereux et non applicable). Nous avons choisi de mettre au point un nouveau protocole qui n'utilise pas l'azote liquide et les kits car notre projet se déroulait dans des pays où l'obtention de ces kits pouvait poser problème. Les points forts du nouveau protocole sont :

- 1- Une intégration de traitements mécaniques, enzymatiques et biochimiques pour générer des rendements élevés d'ADN de haute qualité de levures et de moisissures en évitant l'utilisation de kits de purification (Figure III.3).
- 2- Ce protocole est universel, c'est-à-dire qu'il peut être utilisé non seulement pour l'extraction d'ADN de levure et de moisissures, mais aussi pour l'extraction de l'ADN bactérien dans le même temps.



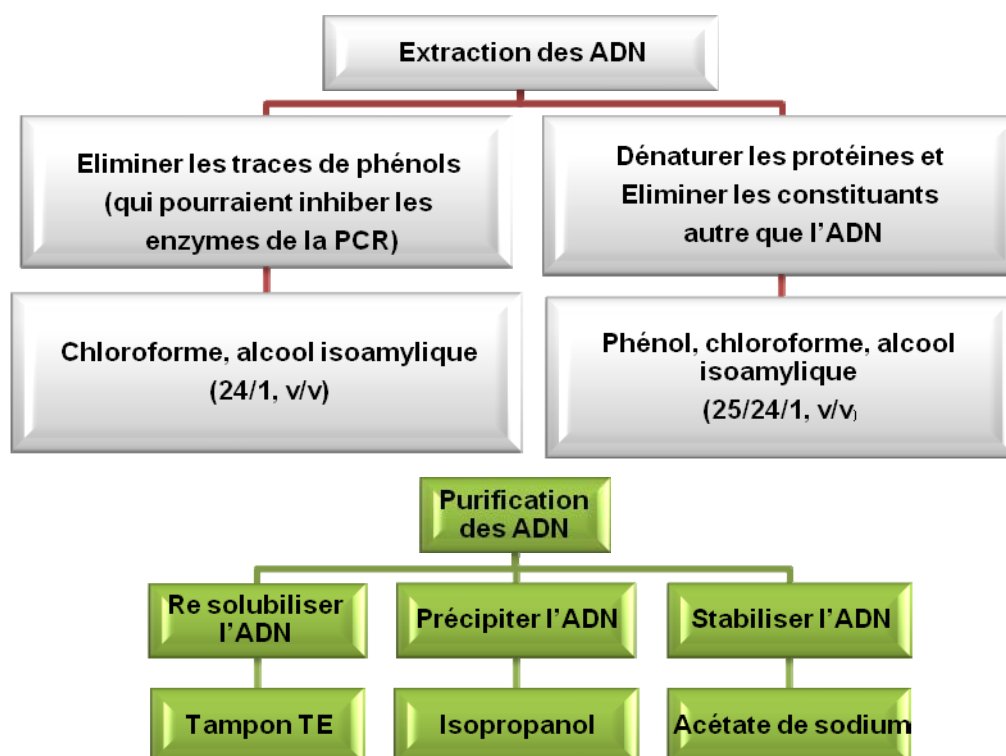


Figure III.3 : Schéma des étapes d'extraction de l'ADN global

II.1.1.1. Protocole d'extraction

Pour l'extraction de l'ADN des levures et des moisissures, El Sheikha *et al.* (2009) et El Sheikha *et al.* (2010) ont créé un nouveau protocole qui prend en compte les méthodes de Masoud *et al.* (2004), Ros Chumillas *et al.* (2007) mettent au point pour l'extraction d'ADN de levure et Karakousis *et al.* (2006) mise au point pour l'extraction d'ADN fongique.

Deux fruits de Physalis ou de karité sont prélevés au hasard et mis dans un sac stérile de Stomacher contenant 6 mL d'eau peptonée puis broyés à la main. Des billes de verre (0,3 g) de 0,5 mm 425 - 600 μ m (Sigma, France) de diamètre en verre lavées à l'acide sont ajoutées à la suspension obtenue dans deux flacons Eppendorff de 2 mL (duplica). Le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 30 min dans un agitateur Vortex (Genie 2 SI-A256, USA) puis centrifugé à 12.000 g pendant 15 min et le surnageant est éliminé.

Le culot cellulaire est resuspendu dans 300 μ L de tampon d'hydrolyse [2% Triton X-100 (Prolabo, France); 1% de SDS, 100 mM NaCl (Sigma, France), 10 mM

Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France)] ; 100 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Promega, France), pH 8,0.

100 μ L de solution de lysozyme (25 mg.mL⁻¹, Eurobio, France) et 100 μ L de solution de protéinase K (20 mg. mL⁻¹, Eurobio, France) sont ajoutés et le mélange est incubé à 42°C pendant 20 min.

Ensuite, 50 μ L de SDS 20% sont ajoutés à chaque tube, puis les tubes sont incubés à 42°C pendant 10 min. 400 μ L de MATAB (Sigma, France) ont été ajoutés à chaque tube qui sont ensuite incubés à 65°C pendant 10 min et agités vigoureusement pendant 5 min.

700 μ L de Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, Carlo Erba, France) est ajouté deux fois et les tubes sont agités au vortex pendant 5 min, puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. La phase aqueuse est transférée dans un flacon Eppendorff et le phénol résiduel est éliminé par extraction avec 600 μ L de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, Carlo Erba, France) et centrifugé pendant 15 min à 12 000 g. La phase aqueuse est recueillie et l'ADN est stabilisé avec 30 μ L d'acétate de sodium (3 M, pH 5), suivie d'une précipitation par ajout d'un volume égal d'isopropanol glacé et l'ADN dans l'isopropanol est conservé à -20°C pendant 12 h (nuit). Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 min, le surnageant est éliminé, les culots d'ADN sont lavés avec 500 μ L d'éthanol à 70%, et les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. L'éthanol est ensuite éliminé et les culots sont séchés à l'air à température ambiante pendant 45 - 60 min. Enfin, l'ADN est remis en suspension dans 50 μ L d'eau ultra pure et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

II.1.1.2. Vérification de l'extraction d'ADN sur gel d'agarose

Avant d'amplifier les séquences cibles de l'ADN extrait, il faut en vérifier son existence et sa pureté par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 0,8% (p/v) dans un tampon TAE 1X (Eppendorf, Allemagne).

8 μ L de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 μ L de la solution du colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puits du gel. Le marqueur de taille moléculaire est un marqueur de 16,21 kb (Invitrogen, USA). La migration dure de 45 min à 1h sous une tension de 100 V.

A la fin de la migration, le gel d'agarose est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Promega, France) à 50 μ g/mL pendant 15 min, puis rincé durant 15 min à l'eau avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est

photographié par une caméra digitale et la photo est traitée grâce au système Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

III.1.1.3. Vérification de la performance d'extraction de l'ADN par le nouveau protocole

La performance du protocole d'extraction d'ADN a été étudiée sur 14 souches pures de levures et 14 souches pures de moisissures. Sur gel d'agarose à 0,8% (p/v), les bandes d'ADN dont le poids moléculaire est supérieur à 16 kb correspondant à l'ADN génomique des champignons, ont été clairement observées. La vérification de la qualité de l'ADN à 260/280 nm en utilisant un NanoDrop (BioSpec-nano, Shimadzu, Japon) a montré que la qualité de l'ADN extrait est élevée. Dans l'ensemble, les rendements les plus élevés en ADN et les ratios A_{260}/A_{280} (1,77 à 2,02) ont été obtenus avec le nouveau protocole d'extraction. Sur les gels de vérification de l'extraction des ADN, des bandes intenses et nettes sont observées dans les zones de hauts poids moléculaires, et des bandes moins intenses dans les zones de faibles poids moléculaires. La position des bandes de hauts poids moléculaires correspond à celles de fragments de plus de 16 kb qui sont sans doute de l'ADN génomique microbien combiné à de l'ADN génomique de moisissures (Figure III. 4) et de levures (Figure III. 5). L'aspect des bandes obtenues rend compte d'une quantité suffisante d'ADN extrait qui permet de réaliser une amplification par PCR. Ceci démontre l'efficacité de la nouvelle méthode au laboratoire pour l'extraction directe des ADN des moisissures et des levures à partir des souches pures extraites d'échantillons de fruits.

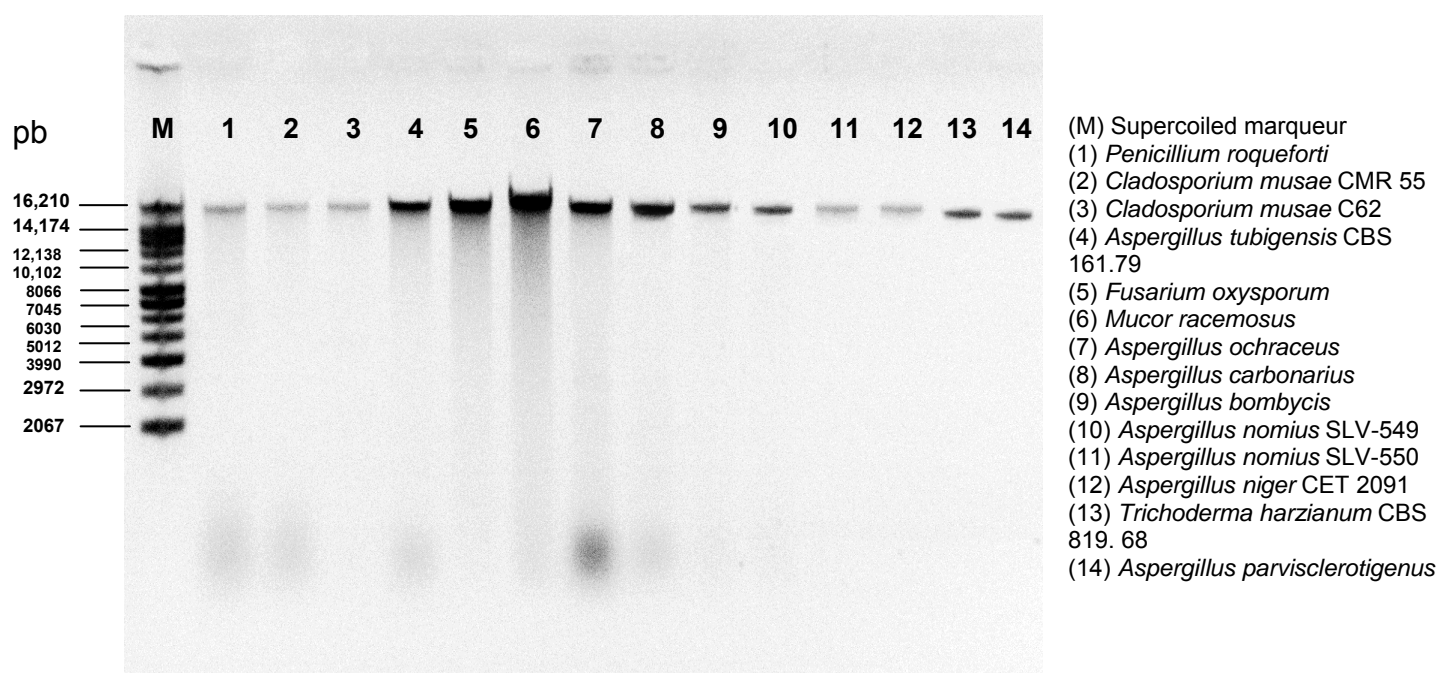


Figure III.4 : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de la performance d'extraction de l'ADN des moisissures par le nouveau protocole

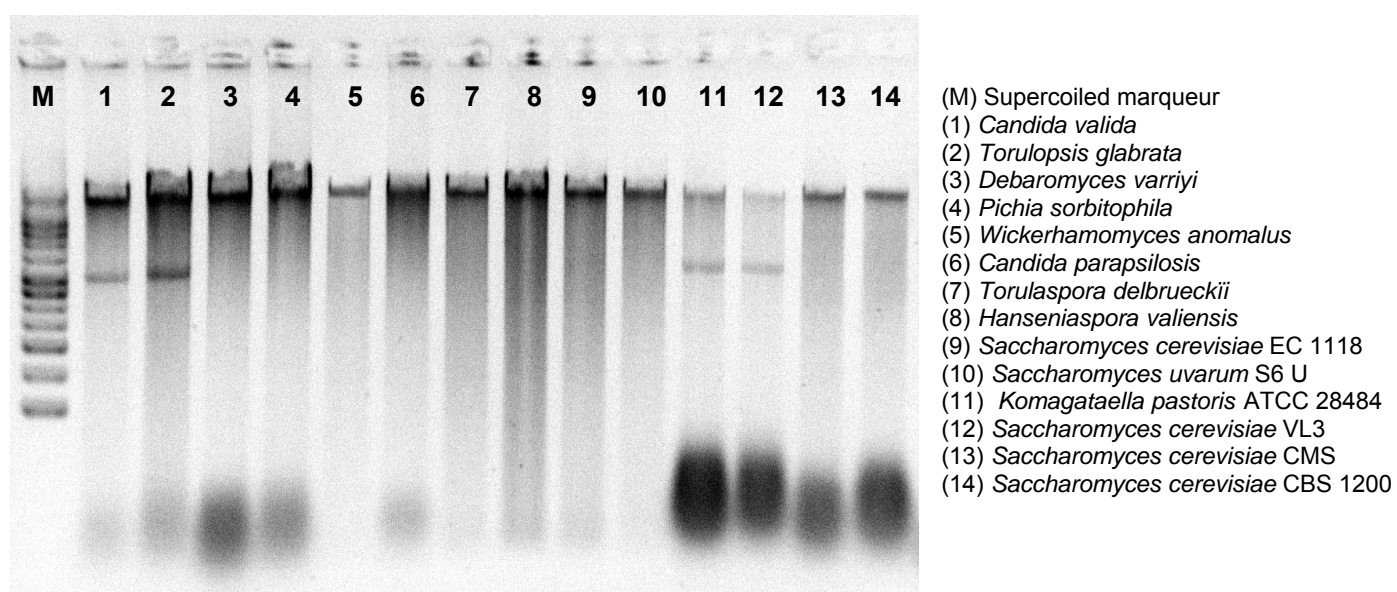


Figure III.5 : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de la performance d'extraction de l'ADN des levures par le nouveau protocole

II.1.1.4. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

* Amorces utilisées

La région D1/D2 de l'ADNr 26/28S est amplifiée en utilisant deux couples d'amorces, un couple pour les levures GC NL1f et LS2r. Ce couple d'amorce couvre la région polymorphe D1/D2 allant des positions 27 à 50 pour NL1f et 266 à 285 pour LS2 du gène de l'ARN 26S du ribosome de *Saccharomyces cerevisiae* (M19229 numéro d'accèsion GenBank). Ils donnent un amplicon de 258 pb en cas d'utilisation en PCR (Cocolin *et al.*, 2000 ; El Sheikha *et al.*, 2009 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a). Le deuxième couple pour les moisissures est GC U1f et U2r. Le Primer U1 correspond aux coordonnées de 403 à 422, et l'amorce U2 correspond aux coordonnées de 645 à 662 d'un ADN de référence *S. cerevisiae* de 28S gènes (J01355 numéro d'accèsion GenBank). Ils donnent un amplicon de 260 pb en cas d'utilisation en PCR (Sandhu *et al.*, 1995 ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008 ; Khot *et al.*, 2009 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010b,c). Pour la méthode DGGE, un GC-clamp de 30 nucléotides est ajouté aux deux amorces NL1f et U1f à l'extrémité 5' afin d'assurer que le fragment d'ADN demeura partiellement bicaténaire (Sheffield *et al.*, 1989) (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Séquence des amorces pour les levures et les moisissures utilisées en PCR

Amorces	Position*	Séquences
Pour les levures		
GCNL1f (Sigma, France)	27 - 50	5'- <u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC</u> GGA GGA AAA G - 3'
LS2r (Sigma, France)	266 - 285	5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC - 3'
Pour les moisissures		
GCU1f (Sigma, France)	403 - 422	5'- <u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG GTG AAA TTG TTG AAA</u> GGG AA - 3'
U2r (Sigma, France)	645 - 662	5'- GAC TCC TTG GTC CGT GTT - 3'

*Numérotation établie pour *S. cerevisiae*.

*** Préparation du mélange réactionnel de PCR**

La PCR est réalisée dans une plaque de 96 puits SorensonTM (BioScience, USA).

Pour les levures : Le mélange réactionnel est préparé comme décrit par El Sheikha *et al.* (2009) ; El Sheikha (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010a).

Pour les moisissures : Le mélange réactionnel est préparé comme décrit par El Sheikha et Montet (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010b,c) (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Composition du mélange réactionnel de PCR des levures et des moisissures

Réactifs	Volume par puits (µL)	Concentration finale dans le mix (50µL)
<i>Pour les levures</i>		
Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	18,75	/
Amorce GC NL1f (Sigma, France)	10	0,2 µM
Amorce LS2r (Sigma, France)	10	0,2 µM
MgCl ₂ 25 mM (Promega, France)	1	1,5 mM
dNTPs 10mM par dNTP (Promega, France)	3	0,2 mM
Tampon tag, 10X (Promega, France)	5	1
Taq polymerase 5U/µL (Promega, France)	0,25	1,25 U
Extrait d'ADN	2	/
<i>Pour les moisissures</i>		
Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	16,25	/
DMSO	2,5	/
Amorce GC U1f (Sigma, France)	10	0,2 µM
Amorce U2r (Sigma, France)	10	0,2 µM
MgCl ₂ 25 mM (Promega, France)	1	1,5 mM
dNTPs 10mM par dNTP (Promega, France)	3	0,2 mM
Tampon tag, 10X (Promega, France)	5	1
Taq polymerase 5U/µL (Promega, France)	0,25	1,25 U
Extrait d'ADN	2	/

*** Condition de la PCR et appareillage**

Des hybridations non spécifiques peuvent se créer lors de la réaction PCR. Ces hybridations sont dues à l'appariement de microséquences complémentaires. Les réactions de PCR s'effectuent dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cyclor, MJ Research Inc., USA).

Pour les levures : Pour l'amplification, une PCR est préconisée selon les méthodes de Hesham *et al.* (2006) ; El Sheikha *et al.* (2009) ; El Sheikha (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010a) (Figure III.6). Une dénaturation initiale à 95°C

pendant 5 min, puis une série d'opérations répétées 30 fois incluant une dénaturation à 95°C pendant 1 min, une hybridation à 52°C pendant 2 min, et une élongation à 72°C pendant 2 min. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 min.

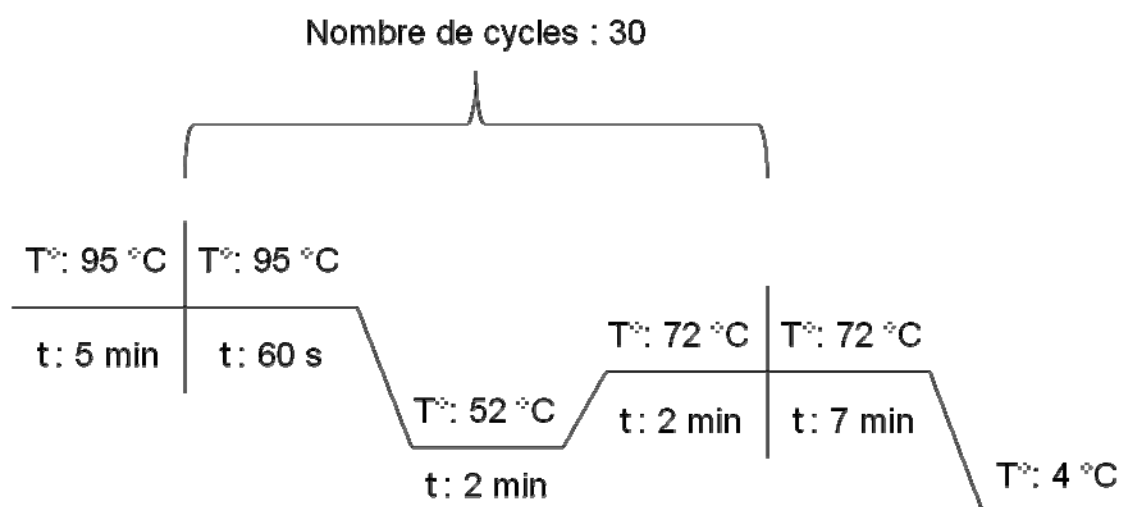


Figure III.6 : Conditions de réaction de la PCR pour les levures

Pour les moisissures : Pour l'amplification, une PCR est préconisée selon les méthodes de El Sheikha et Montet (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010b,c) (Figure III.7). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, puis une série d'opérations répétées 30 fois incluant une dénaturation à 94°C pendant 45 s, une hybridation à 50°C pendant 50 s, et une élongation à 72°C pendant 90 s. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min.

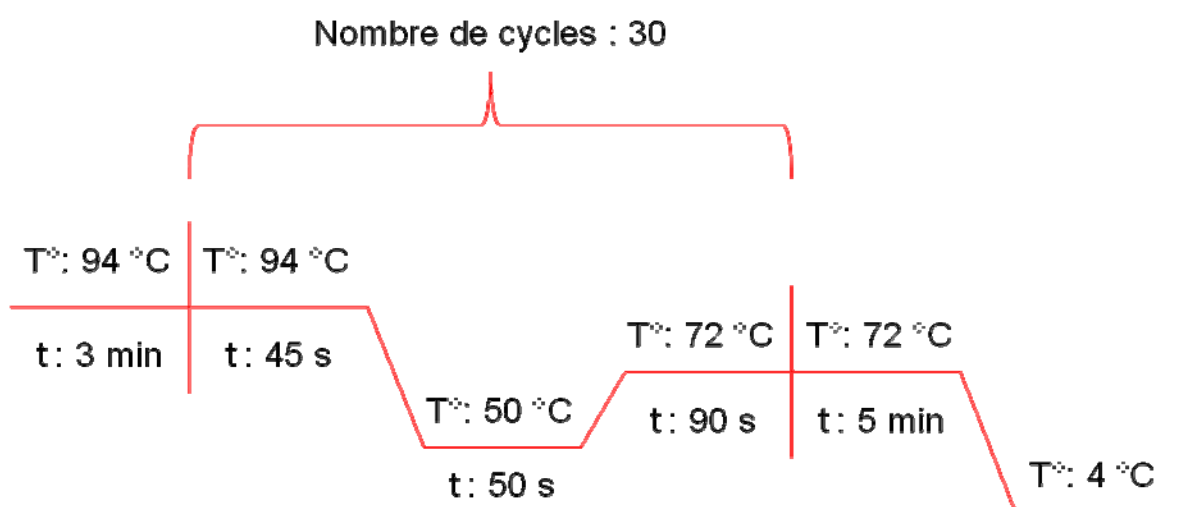


Figure III.7 : Conditions de réaction de la PCR pour les moisissures

* Vérification des produits PCR

Avant de réaliser la migration sur le gel de DGGE, les amplicons de PCR doivent être vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2% (p/v) dans un tampon TAE 1X. La méthode est la même qu'au chapitre II.2.2.

La taille attendue des produits PCR sont de 250 pb pour les levures et de 260 pb pour les moisissures. Le marqueur de taille est un marqueur de 100 pb (Promega, France). La migration dure 30 min sous une tension de 100 V.

III.1.1.5. Confirmation de la qualité de l'ADN

La qualité de l'ADN a été confirmée par l'amplification par PCR avec succès de la région conservée des ADNr 26S des levures et des ADNr 28S fongiques.

Les résultats de l'amplification par PCR par les amorces GC U1f, U2 de l'ADN des moisissures et GC NL1f, LS2r de l'ADN des levures extraits des souches pures sont visibles sur les figures III.8 et III.9. Sur les gels d'agarose, les produits de PCR donnent des bandes uniques, nettes et intenses situées entre 298 pb et 220 pb, ce qui correspond à la taille attendue qui est de 260 pb pour les moisissures et de 250 pb pour les levures. Le témoin négatif a été réalisé avec le mélange réactionnel sans ajout d'ADN extrait. L'absence de bande pour le témoin négatif montre qu'il n'y a pas de contamination du mélange réactionnel de PCR. Les résultats obtenus montrent que la qualité et la quantité des ADN totaux extraits des moisissures et des levures sont bonnes et qu'aucun inhibiteur ne semble avoir une influence sur la réaction d'amplification.

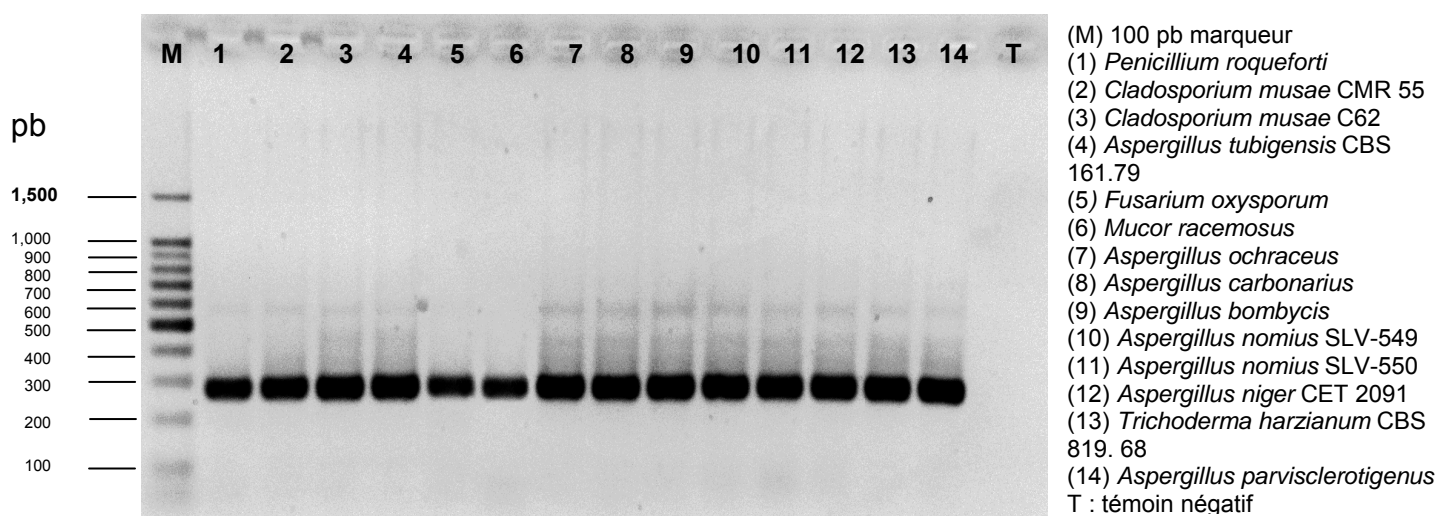


Figure III.8 : Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification de l'ADN des moisissures

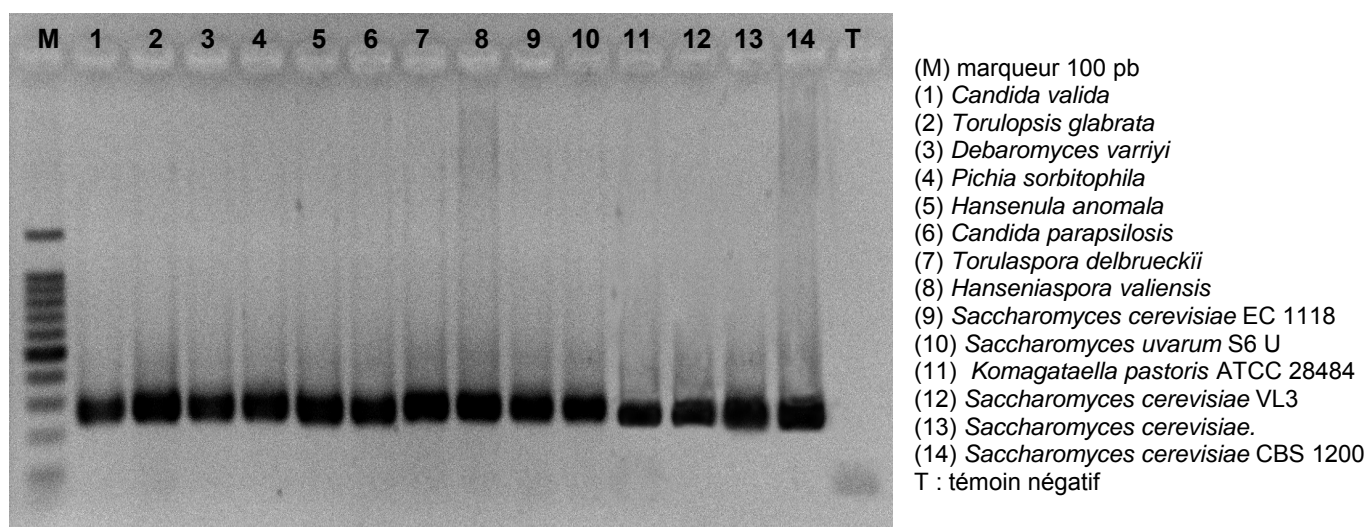


Figure III.9 : Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification de l'ADN des levures

II.1.1.6. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

* Composition du gel de DGGE

Les fragments d'ADNr 26/28S amplifiés par PCR sont analysés par DGGE dans un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1, v/v, Promega, France) contenant un gradient de dénaturant chimique qui s'étend de 30% à 60% pour les levures (El Sheikha *et al.*, 2009 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a) et 40% à 70% pour les moisissures (El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010b,c) constitué d'urée (Promega, France) et de formamide (Promega, France) (Tableau III.3). L'appareil de DGGE utilisé est le modèle Biorad Dcode (Biorad, USA).

Tableau III.3 : Composition des gels de DGGE pour un gradient dénaturant de 30 à 60% (pour les levures) et 40 à 70% (pour les moisissures)

Constituants	30% de dénaturant	60% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	20 mL	20 mL
Formamide	12 mL	24 mL
Urée	12,6 g	25,2 g
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100 mL
Constituants	40% de dénaturant	70% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	16.8 g	29.4 g
Formamide	20 mL	20 mL
Urée	16 mL	28 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100 mL

* Préparation du gel DGGE

Dans deux tubes de 50 mL d'un préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485, USA) (Figure III.10) sont mélangés respectivement 16 mL des solutions froides (stockées à 4°C) de 30% ou 60% et de 40% ou 70% de dénaturants auxquels sont ajoutés 50 µL de persulfate d'ammonium (APS) (Promega, France) à 10% p/v en eau distillée et 50 µL de Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Promega, France).

Le gel est coulé dans un moule de 0,75 mm d'épaisseur entre deux plaques de verre de 200 mm de côté. Une pompe Percom-I, Watson-Marlon (USA) réglée à 20 tours/min permet de transférer le gel du préparateur de gradient jusqu'au moule. La durée de polymérisation du gel est au minimum d'une heure.

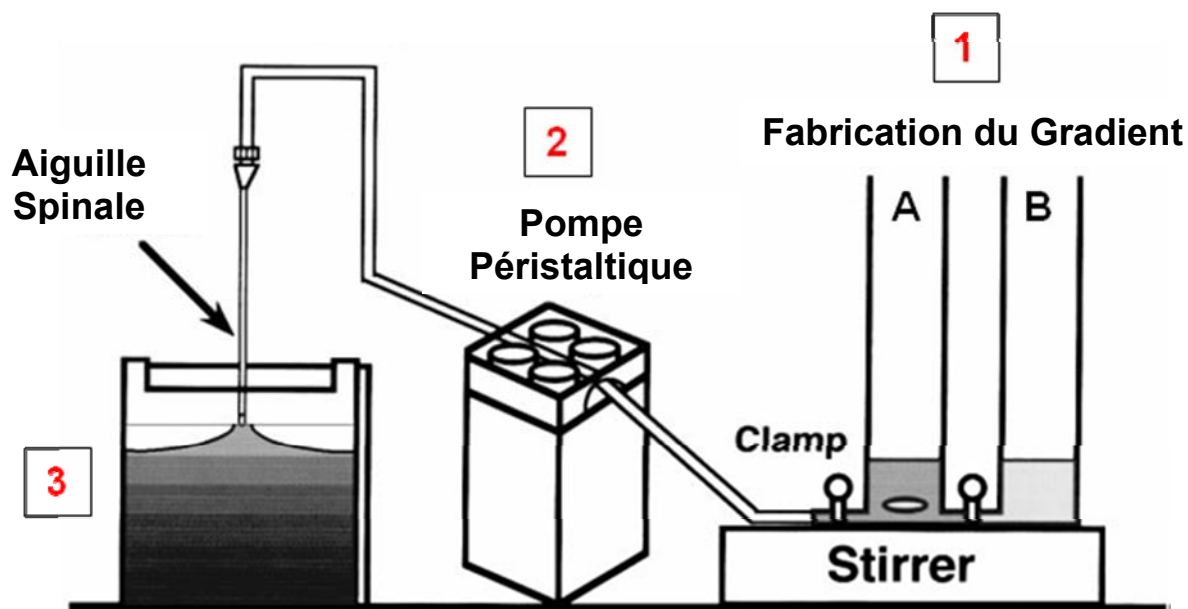


Figure III.10 : Préparation du gel de DGGE :

(1) Fabrication du gradient, A: solution de haute concentration en dénaturant (60% pour levures ou 70% pour les moisissures), B: solution à faible concentration en dénaturant (30% pour levures ou 40% pour les moisissures) + (2) Pompe péristaltique (3) sandwich des deux plaques de verre insérant le gel

* Conditions électrophorétiques de la DGGE

La cuve d'électrophorèse (Bio-Rad DCode System, USA) est remplie de tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA pH 8,3). Elle est préchauffée préalablement pendant 1h à 1h30 avant les dépôts pour atteindre la température de migration de 60°C (Díez *et al.*, 2001).

Le gel de DGGE est placé dans la cuve préchauffée à 60°C et 10 µL de colorant bleu/orange (Promega, France) et 30 µL des produits issus de la PCR sont déposés par puits à la micropipette.

L'électrophorèse est exécutée en deux périodes successives, à 20 V pendant 10 min puis à 80 V pendant 12h pour les levures (El Sheikha *et al.*, 2009 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a) et 16h pour les moisissures (El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010b,c). Après la migration, le gel est retiré délicatement des plaques de verre et immergé dans une solution de Bromure d'éthidium (Promega, France) à 0,5 µg/mL pendant 30 min puis rincé avec de l'eau distillée (ou par du tampon TAE 1X) pendant 20 min. Le gel est ensuite observé sur le trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et traité grâce au system Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

* Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE

L'image qui est visualisée sur l'écran d'ordinateur est enregistrée sous format .tif en négatif (bandes d'ADN noires sur fond clair).

Les fichiers des gels sont ensuite traités par le logiciel ImageQuantTL® version 2003 (Amersham Biosciences, USA).

Afin d'étalonner nos gels, nous avons utilisé 2 produits d'amplification d'ADN de souches pures de levures, soit une souche de *Wickerhamomyces anomalus* et une souche de *Komagataella pastoris* et pour les moisissures, soit une souche de *Mucor racemosus* et une souche de *Trichoderma harzianum*. Ces 2 témoins permettent de vérifier le bon déroulement de la DGGE et servent de témoin de position pour situer les différentes bandes obtenues des échantillons lors de la comparaison des profils de levures ou de moisissures d'un gel à l'autre.

La différence entre les témoins (*Wickerhamomyces anomalus* et *Komagataella pastoris* ou *Mucor racemosus* et *Trichoderma harzianum*) est calculée et appelée DTe. Ensuite on prend comme référence la bande de *Wickerhamomyces anomalus* ou *Mucor racemosus*, et pour chaque bande X on calcule la différence entre la bande (X) et la bande de *Wickerhamomyces anomalus* ou *Mucor racemosus* que l'on appelle d (Figure III.11).

La position relative (PR) de chaque bande est calculée selon la formule :

$$PR(X) = \frac{d}{DT_e}$$

Ainsi, chaque bande d'ADN est caractérisée par sa position relative.

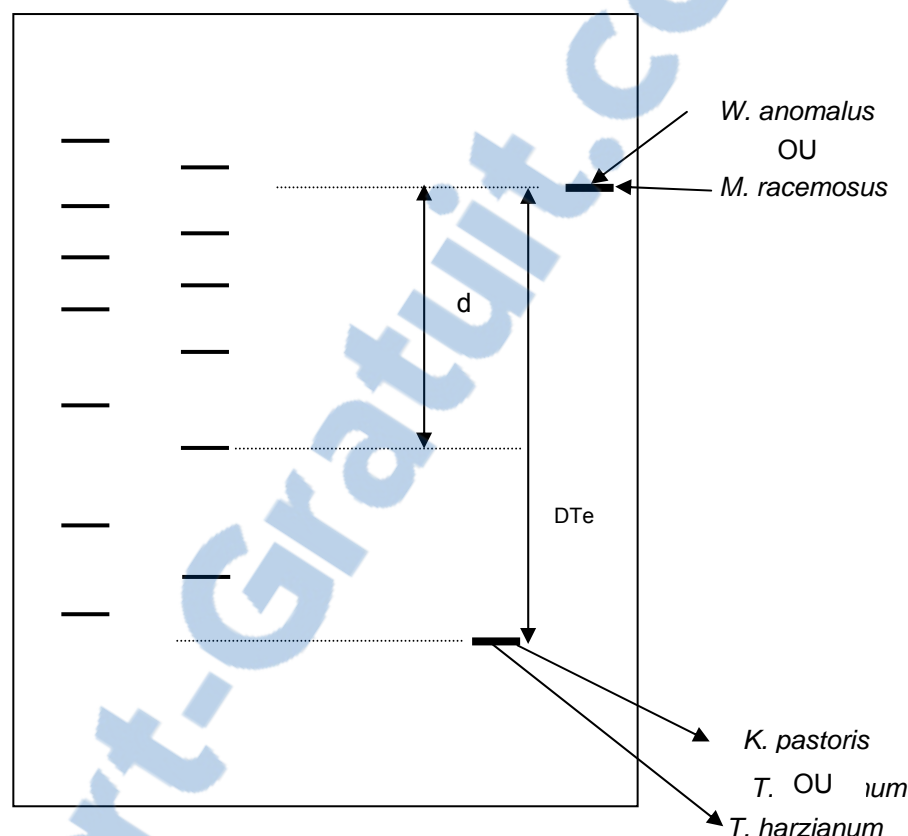


Figure III.11 : Calcul des distances par exploitation d'un gel DGGE

Les profils DGGE diffèrent par le nombre, la position ou l'intensité des bandes pour chaque piste correspondant aux dépôts de produit de PCR obtenu à partir d'un extrait d'ADN. Il est possible pour chaque piste de coder la présence ou l'absence d'une bande à une position particulière par 1 (présence) ou 0 (absence) et de construire une matrice binaire à partir de laquelle un dendrogramme de distances est calculé (Schäfer et Muyzer, 2001 ; Fromin *et al.*, 2002).

Le coefficient de similarité de Dice a été utilisé (Heyndrickx *et al.*, 1996) selon la formule :

$$S_{Dice} = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$$

Où :

N_{AB} représente le nombre de bandes communes aux échantillons (profils),

N_A et N_B : représentent le nombre de bandes dans les échantillons A et B, respectivement.

Une fois la matrice des distances calculée, la méthode statistique UPGMA (Unweighed Pair-Wise Grouping With Mathematical Averages) est utilisée pour tracer un dendrogramme qui illustre la classification des profils.

La méthode UPGMA est une méthode d'analyse des données binaires qui permet la construction de dendrogrammes et qui dépeint les distances en forme graphique, basées sur le degré de "dissimilarité" entre profils DGGE. Ce qui permet une classification numérique des échantillons en utilisant le coefficient de similarité de Dice (Kowalchuk *et al.*, 1997 ; Lebaron *et al.*, 1999 ; Gelsomino *et al.*, 1999 ; Griffiths *et al.*, 2000 ; Ibekwe *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé en utilisant le logiciel Statistica version 7.1 (StatSoft, France).

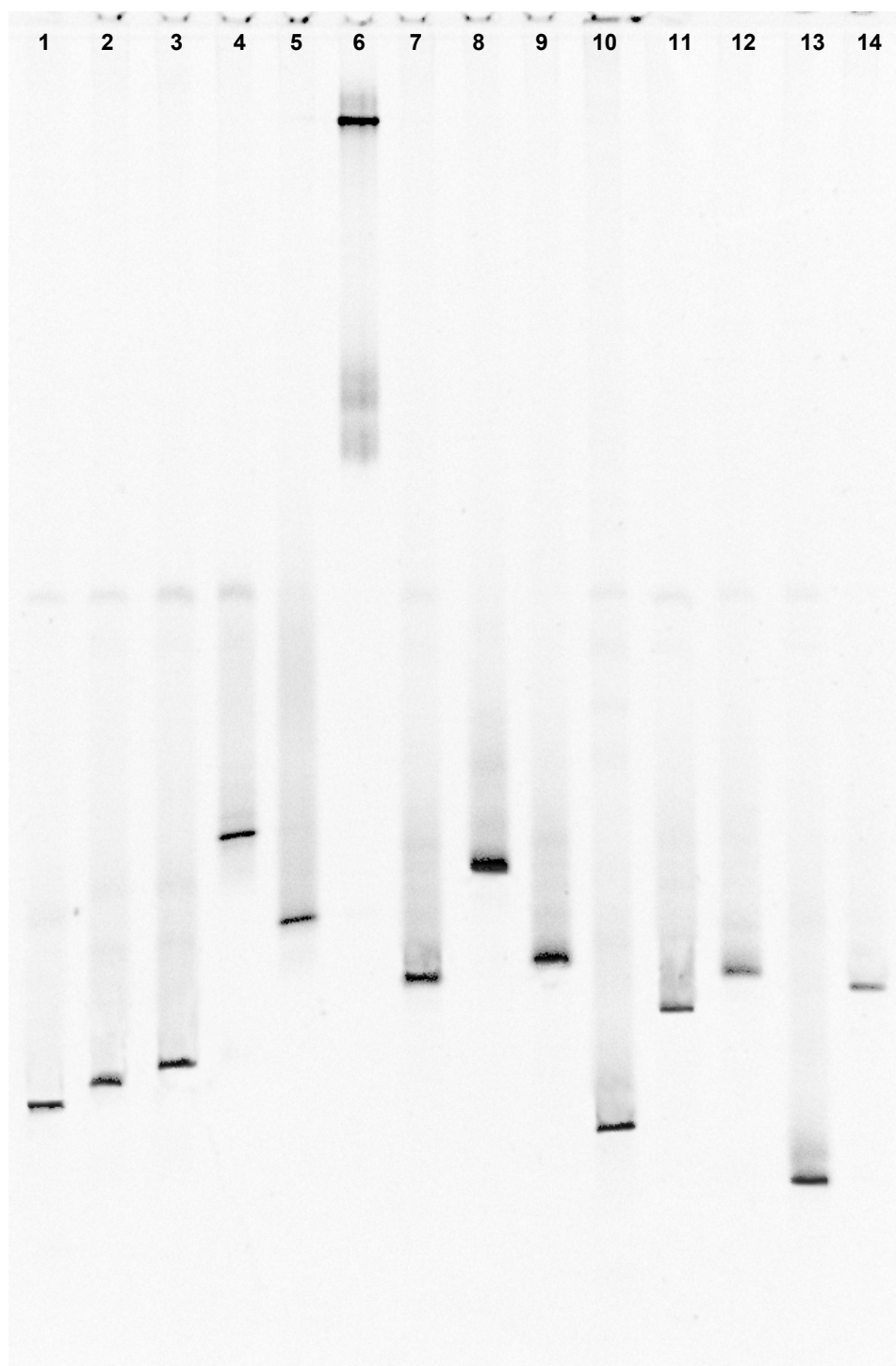
* Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE

Les bandes visibles sur le gel de DGGE sont découpées à partir du gel avec un scalpel stérile. L'ADN de chaque bande est ensuite élué dans 100µL du tampon TE à 4°C durant la nuit. 100µL de l'ADN élué à partir de chaque bande a été purifié grâce au kit Wizard PCR Preps DNA Purification system (Promega, France) (Annexe 2) puis a été ré-amplifié dans les mêmes conditions mais en utilisant dans ce cas des amorces sans GC-clamp et ensuite envoyé pour leur séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). L'efficacité de cette procédure a été vérifiée par l'électrophorèse des amplicons de PCR obtenus sur gel DGGE. Pour les bandes de même position sur le gel DGGE et pour des pistes différentes, une seule bande représentative a été purifiée puis réamplifiée avec l'amorce sans GC clamp. Cependant, quelques bandes issues de la même position ont été séquencées afin de vérifier si elles n'étaient pas issues de la même espèce. Les séquences des ADNr 26S et 28S obtenues ont été comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

III.1.1.7. Application de la DGGE à l'analyse des levures et moisissures

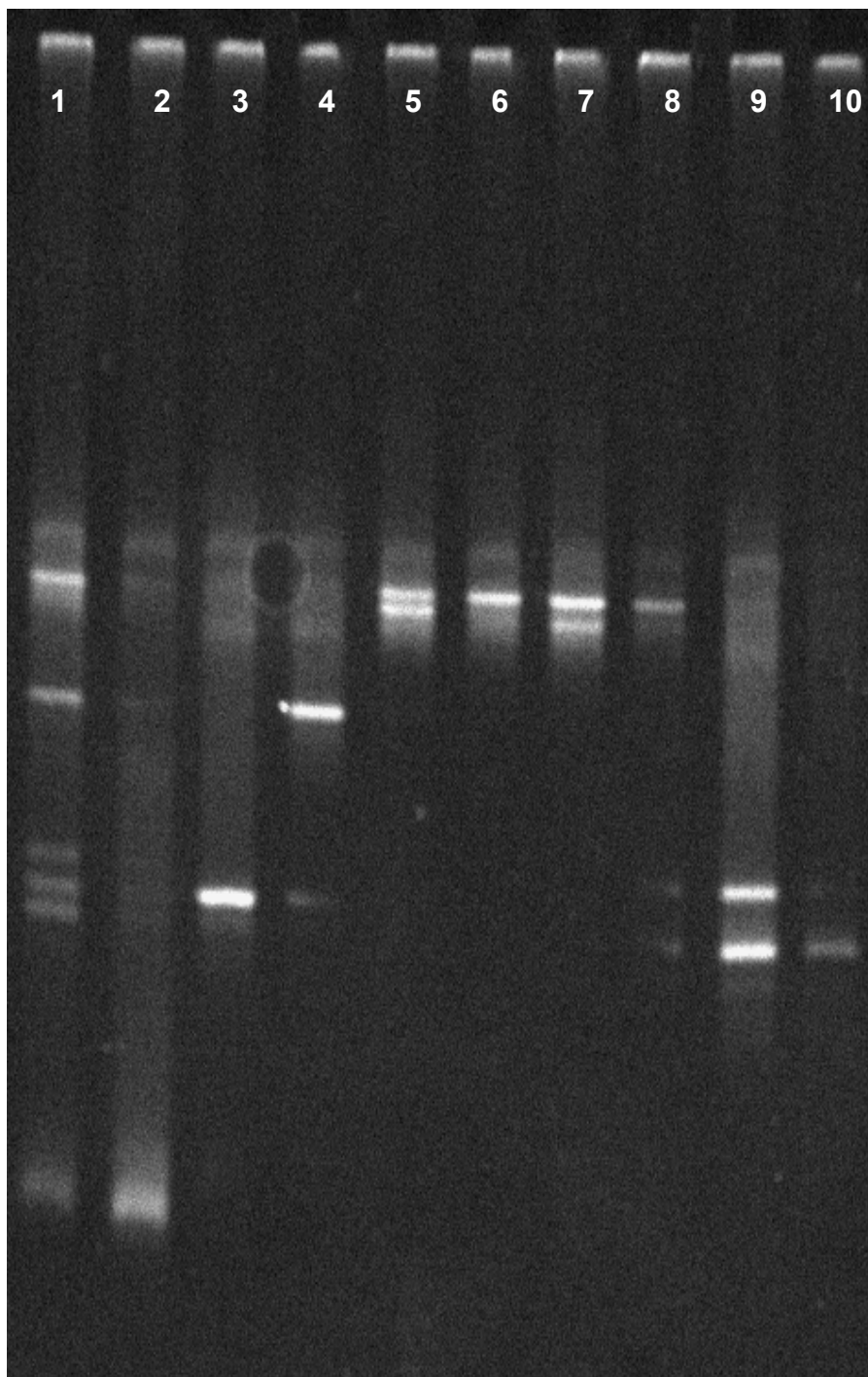
L'étude de la variation des distances de migration sur gel de DGGE de l'ADN de quatorze espèces de champignons (moisissures et levures) a montré une très bonne séparation pour tous les amplicons (Figure III.12 et Figure III.13). La méthode

améliorée de DGGE est donc rapide (moins de 24 h) et permet d'analyser de nombreuses levures ou moisissures en une seule étape. La séparation des amplicons de moisissures est très bonne alors que pour les levures, on observe certaines bandes qui ont approximativement la même distance de migration comme par exemple *Debaromyces varriyi* et *Pichia sorbitophila*



- (1) *Penicillium roqueforti*
- (2) *Cladosporium musae* CMR 55
- (3) *Cladosporium musae* C62
- (4) *Aspergillus tubigensis* CBS 161.79
- (5) *Fusarium oxysporum*
- (6) *Mucor racemosus*
- (7) *Aspergillus ochraceus*
- (8) *Aspergillus carbonarius*
- (9) *Aspergillus bombycis*
- (10) *Aspergillus nomius* SLV-549
- (11) *Aspergillus nomius* SLV-550
- (12) *Aspergillus niger* CET 2091
- (13) *Trichoderma harzianum* CBS 819. 68
- (14) *Aspergillus parvisclerotigenus*

Figure III.12 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés de l'ADN de différentes moisissures



- (1) Mix (2 + 3 + 4 + 7 + 9 + 10)
- (2) *Candida valida*
- (3) *Troulopsis glabrata*
- (4) *Torulaspora delbrueckii*
- (5) *Candida parapsilosis* + *Debaromyces varriyi*
- (6) *Candida parapsilosis*.
- (7) *Wickerhamomyces anomalus* + *Pichia sorbitophila*
- (8) *Wickerhamomyces anomalus*
- (9) *Saccharomyces uvarum* S6 U + *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118
- (10) *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118

Figure III.13 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés de l'ADN de différentes levures

II.1.1.8. Étude de la variabilité de la position des bandes et de la répétabilité des gels DGGE

L'objectif est d'étudier la répétabilité, la fiabilité et la robustesse de la PCR-DGGE afin de pouvoir trouver le nombre minimal d'échantillons (2 fruits)

suffisamment représentatifs de l'origine géographique. Nous avons pour cela observé la variabilité de la position d'une bande répétée sur plusieurs puits dans un même gel ainsi que la variabilité de la position d'une bande d'un gel à un autre. L'extraction d'ADN a été réalisée 3 fois séparément sur deux fruits de *Physalis* de 3 sacs différents qui provenaient de la région d'El Sadat dans le gouvernement de Minufiya (Égypte) (Figure III.14). Trois PCR séparées ont été réalisées sur les 3 extraits d'ADN des levures issues de deux fruits puis chaque produit de PCR a été déposé 5 fois sur le même gel pour réaliser 5 dépôts pour chacun des 3 gels DGGE différents, c'est-à-dire 15 dépôts au total.

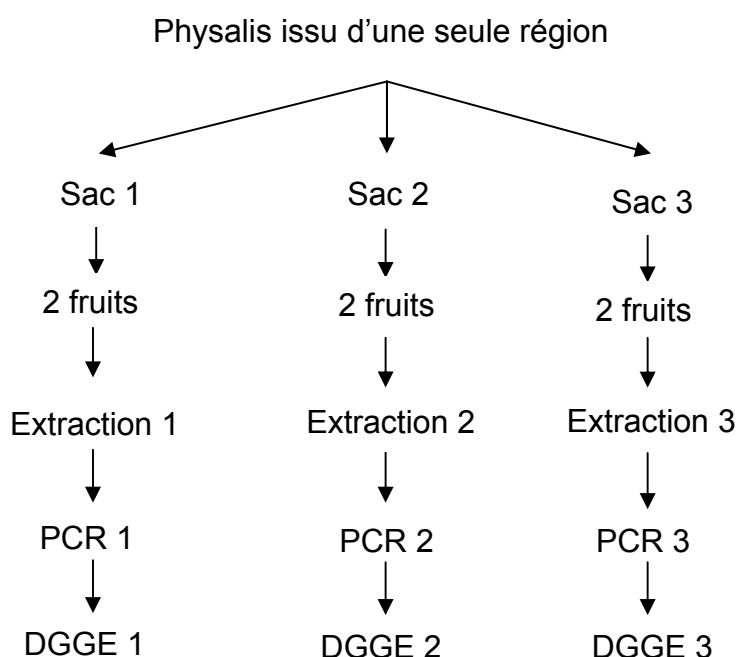


Figure III.14 : Plan expérimental pour étudier la variabilité de la position des bandes et de la répétabilité des gels de DGGE

Après la migration en DGGE, la position de toutes les bandes a été identifiée, le ratio de migration a été calculé par rapport aux témoins (produits PCR de l'ADN de *Wickerhamomyces anomalus* et *Komagataella pastoris* pour les levures) afin de définir une position relative de chacune des bandes.

Les résultats de DGGE des ADN extraits des levures sont visibles sur les photos de trois gels de DGGE présentés sur la figure III.15. Sur chaque gel sont analysés les produits de trois PCR de trois extraits d'ADN obtenus indépendamment de deux fruits de *Physalis* de 3 sacs différents qui provenaient de la même région. Chaque produit de PCR est déposé 5 fois sur le même gel. En plus de cela, les

produits de la PCR d'ADN extrait des deux souches témoins *Wickerhamomyces anomalus* et *Komagataella pastoris* sont déposés sur chaque gel.

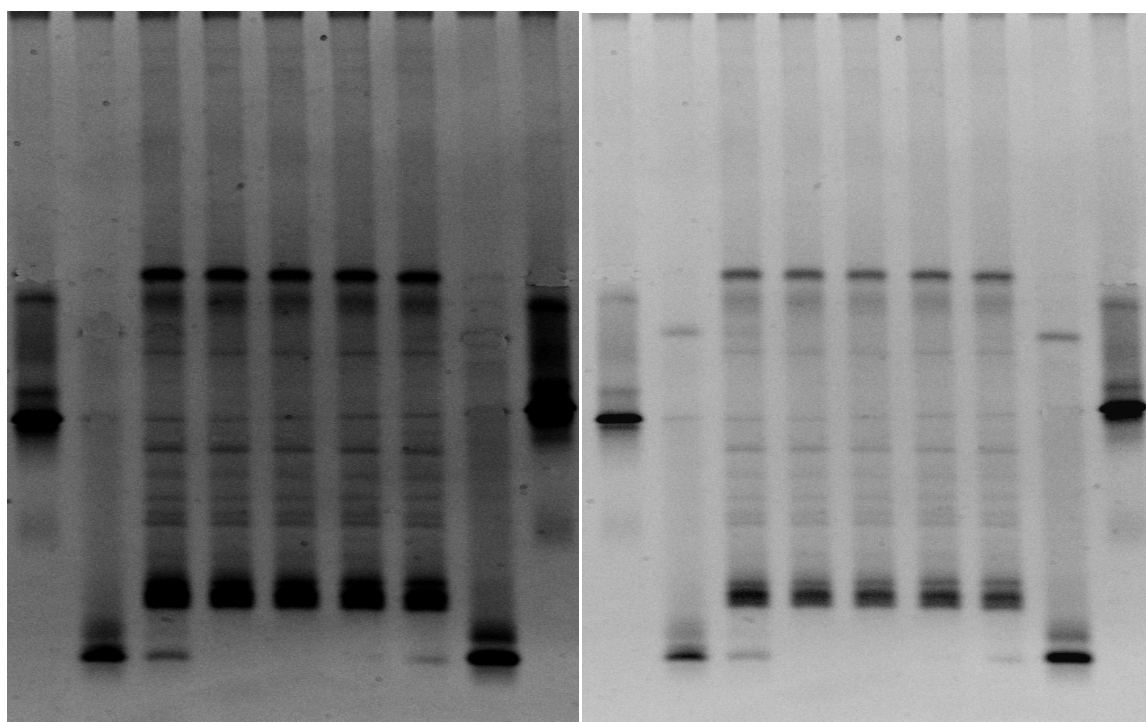
Sur le gel qui concerne les résultats obtenus avec les ADN extraits de levures de deux fruits de *Physalis*, on observe 10 bandes intenses et bien séparées. L'hypothèse à l'origine de ce travail est que la caractérisation de l'origine du *Physalis* est due à la présence d'une souche de levure et sa combinaison avec d'autres souches et non au niveau de population de telle ou telle souche. Le succès de cette approche est en relation directe avec la capacité de donner l'image la plus fidèle des souches des levures présentes dans les échantillons. C'est ce que permet la PCR-DGGE telle que nous la réalisons car elle conduit à un profil électrophorétique qui peut être considéré comme une image de l'ensemble des souches des levures présentes dans les échantillons analysés. Chaque bande discrète et individuelle se rapporte à un unique phylotype (souche ou clone) (Muyzer *et al.*, 1993 ; Van Hannen *et al.*, 1999). Il est donc essentiel que l'ADN des différentes souches de levures soient extraits avec le meilleur rendement possible. Cependant l'étape d'amplification par PCR qui est conduite sur un mélange de séquences cibles et de concentrations différentes fait que compte tenu des lois cinétiques, une souche de levure plus abondante voit son amplification conduire à d'avantage de produits de PCR et donc à une bande plus intense. Dans ces conditions, la concentration seuil de visualisation des souches des levures varie en fonction de l'importance de sa population et aussi de celles des autres souches. Il est important de réaffirmer que la clé de l'analyse et l'utilisation des profils de PCR-DGGE est la position de chacune des bandes sur le gel par rapport à la position du dépôt, soit la distance de migration.

Cette distance peut varier d'un gel à un autre pour de multiples causes :

- La qualité du gel dont la fabrication n'est pas normalisée,
- la qualité du courant électrique appliqué,
- la régulation de la température de la cuve,
- les paramètres de prise de vue et d'impression qui modifient les dimensions du gel.

Dans ces conditions, nous avons choisi d'utiliser deux souches témoins dont les amplicons uniques migrent différemment et de calculer pour chaque bande la

valeur de sa position relative. Ainsi la position de chaque bande est caractérisée par la valeur du ratio égal à la distance entre la bande analysée et celle de la bande de la souche du *Wickerhamomyces anomalus* sur la valeur de la distance entre les deux bandes des souches témoins. La répétabilité est étudiée en comparant les moyennes des positions relatives des 10 bandes des 3*5 produits analysés au moyen d'un test de comparaison de moyenne (Test de la plus petite différence significative de Fischer) grâce au logiciel Statistica version 7.1 (Statsoft, France) (Tableau III.4).



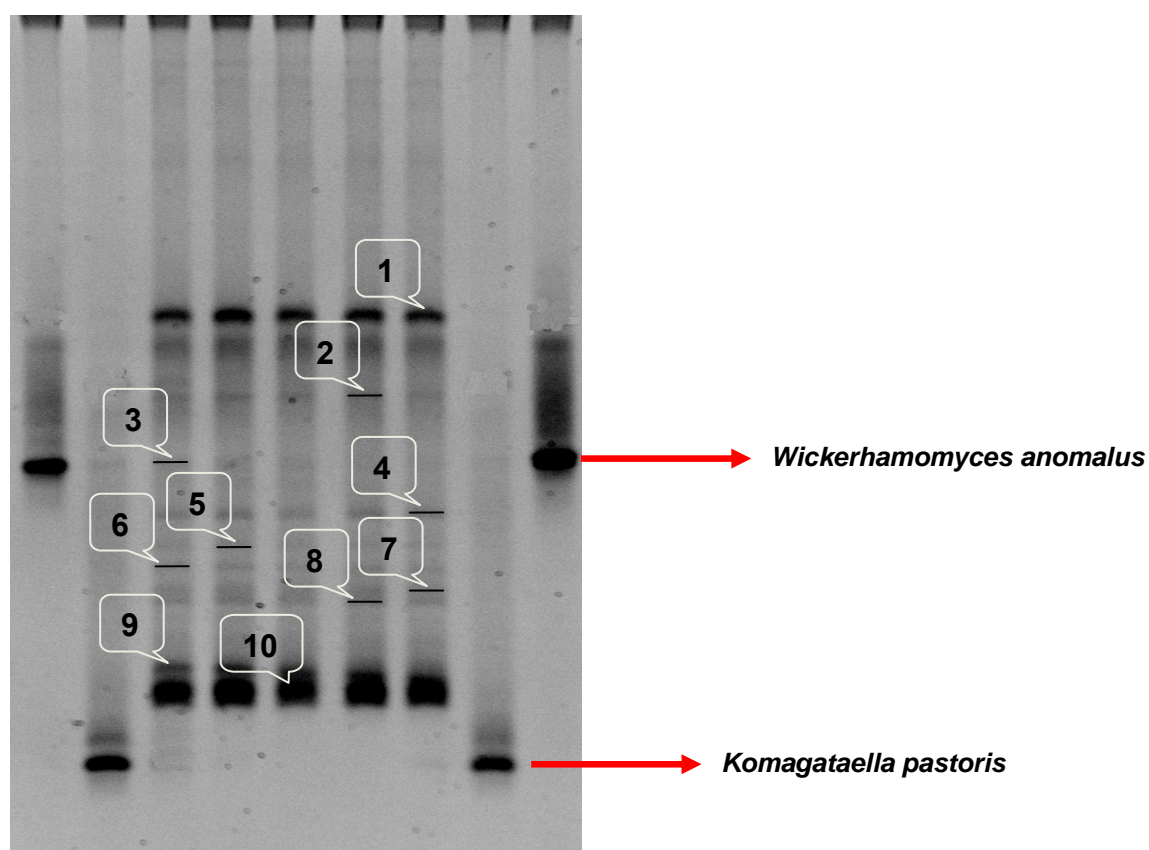


Figure III.15 : Photo de 3 gels indépendants de DGGE d'ADN des levures extraites de deux fruits de Physalis (Minufiya/Égypte), et amplifiés lors de 3 PCR indépendantes. Chaque produit de PCR est déposé 5 fois

Tableau III.4 : Valeur de la moyenne et de l'intervalle de confiance (IC au risque 5%) des distances relatives de migration pour 10 bandes présentes sur 3 gels de DGGE indépendants, les dépôts ont été répétés 5 fois sur chaque gel

		Gel 1	Gel 2	Gel 3
Bande 1	moyenne	0,376 ^a	0,382 ^a	0,378 ^a
	IC	2,95%	1,45%	1,47%
Bande 2	moyenne	0,492 ^a	0,488 ^a	0,486 ^a
	IC	1,13%	1,14%	2,28%
Bande 3	moyenne	0,586 ^a	0,588 ^a	0,590 ^a
	IC	1,16%	3,47%	2,10%
Bande 4	moyenne	0,638 ^a	0,634 ^a	0,630 ^a
	IC	0,87%	1,07%	3,41%
Bande 5	moyenne	0,672 ^a	0,664 ^a	0,669 ^a
	IC	0,83%	1,02%	1,67%
Bande 6	moyenne	0,702 ^a	0,700 ^a	0,698 ^a
	IC	0,79%	1,25%	0,80%
Bande 7	moyenne	0,732 ^a	0,736 ^a	0,738 ^a
	IC	1,86%	0,92%	1,19%
Bande 8	moyenne	0,740 ^a	0,742 ^a	0,744 ^a
	IC	1,19%	0,75%	1,51%
Bande 9	moyenne	0,828 ^a	0,822 ^a	0,832 ^a
	IC	0,67%	2,90%	0,66%
Bande 10	moyenne	0,848 ^a	0,844 ^a	0,840 ^a
	IC	1,60%	0,81%	1,04%

IC au risque 5% calculé sur les 3*5 répétitions de chaque bande sur chaque gel.

^a : les petites lettres indiquent l'appartenance des moyennes par ligne à des groupes homogènes (Test LSD au risque 5%).

Malgré la faible variabilité observée au sein de chaque gel (IC < 3,5%), les tests post-hoc réalisés (test de ppds) montrent que la distance relative de chacune des 10 bandes ne diffère pas d'un gel à l'autre ($p < 0,05$).

II.1.1.9. Sensibilité de la méthode

Pour étudier la sensibilité de la DGGE, il faut tester les limites de détection des levures ou moisissures. Des dénombrements de levures et moisissures ont donc été réalisés afin de savoir quel est le nombre de levures en Unités Formant Colonies (UFC/mL) et le nombre de spores de moisissures/mL pouvant être détectées par DGGE.

**** Sensibilité de la DGGE pour l'analyse des levures***

L'étude de la sensibilité de la DGGE a été réalisée sur une souche pure de levure *Candida valida*. L'extraction des acides nucléiques a été réalisé sur des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} dans un bouillon nutritif YPD afin d'obtenir différentes concentrations de levures (Tableau III.5). Les dilutions sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 heures. L'extraction des ADN est réalisée sur 2 mL de chaque dilution de levures après 48 h de culture. La quantité et la qualité de l'ADN est vérifié par dosage au nanodrop (Tableau III.5). L'amplification des ADN extraits est réalisée par PCR puis les produits PCR sont vérifiés sur gel d'agarose (Figure III.16).

Tableau III.5 : Limites de détection de la DGGE sur une culture pure de la levure *Candida valida* après incubation 48 h/30°C

Après incubation 48 h/30°C						
Dilution	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000
UFC/mL	2.1×10^6	2.1×10^5	2.1×10^4	2.1×10^3	2.1×10^2	2.1×10
ADN (ng/μL)	1420	595	195	45	12,5	4,5
Pureté de l'ADN (A_{260}/A_{280})	1.7	1.54	1.6	1.7	1.8	2.5
Amplification PCR	+	+	+	+	+	+
Sensibilité de la DGGE	+	+	+	+	+	-

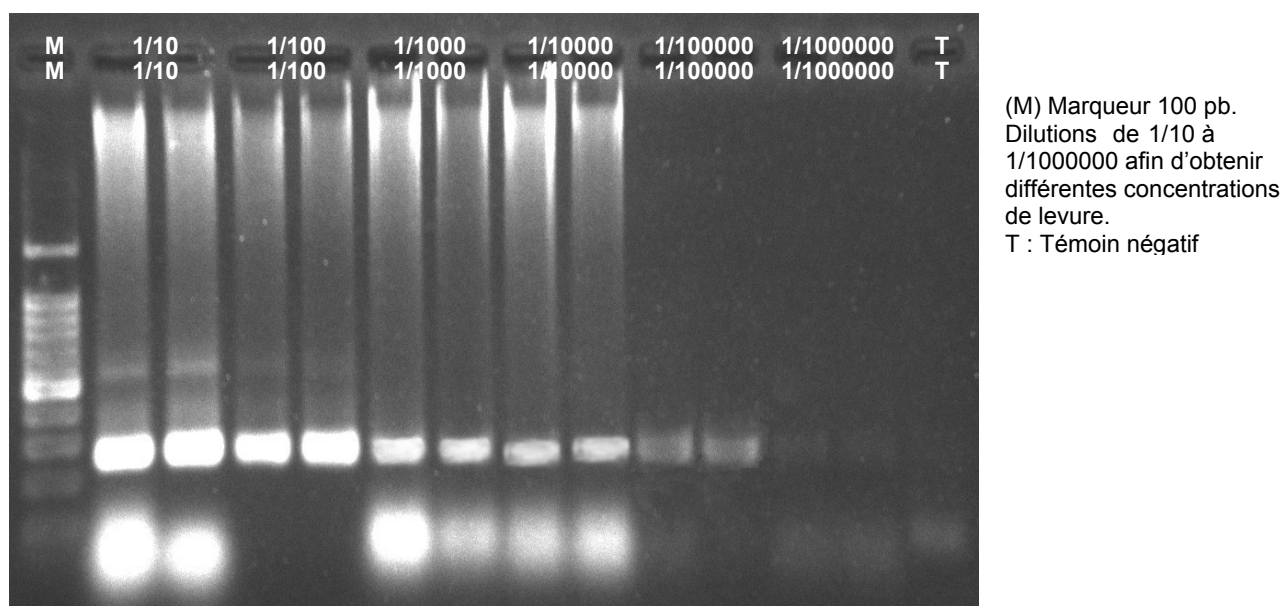
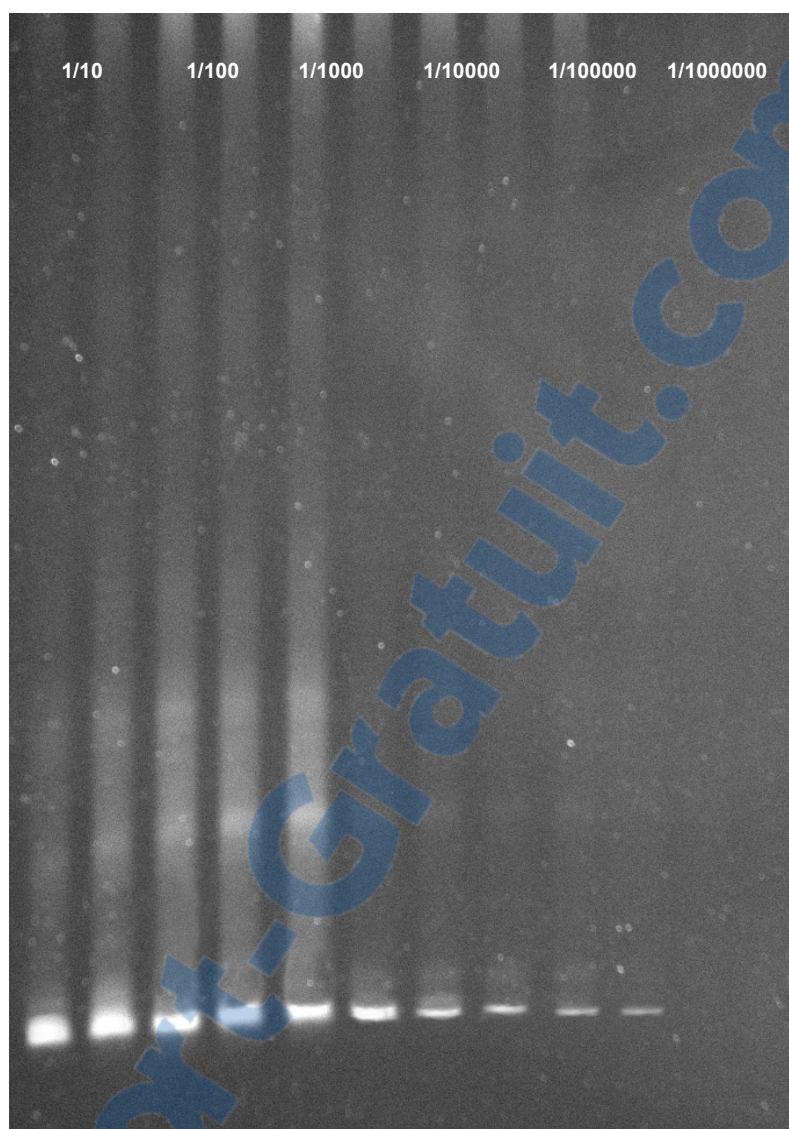


Figure III.16 : Photo de gel d'agarose de vérification de l'amplification de l'ADN des levures en dilutions croissantes après incubation 48 h/30°C

Les résultats sont considérés comme positifs quand il y a amplification par PCR, même si une très faible quantité d'ADN a été extraite. Avec l'étape d'incubation, la limite de détection est 2.1×10^2 UFC/mL après 48 h/30°C (Figure III.17). Cette limite est plus faible que celles trouvées par d'autres auteurs comme par exemple, Cocolin *et al.* (2000) qui annoncent une population minimum de 10^4 CFU/mL nécessaire pour rendre détectable l'espèce considérée. D'autres auteurs comme Prakitchaiwattana *et al.* (2004) avancent que le seuil de détection d'une espèce est fonction du rapport entre les concentrations de chaque espèce. Ils avancent en effet qu'un rapport de concentrations excédant 1 pour 1000 entre plusieurs espèces limite la détection aux espèces majoritaires uniquement.



Dilutions de 1/10 à 1/100000 afin d'obtenir différentes concentrations de levure

Figure III.17 : Photo de gel de DGGE des différentes concentrations de *Candida valida* ($10 - 10^6$ UFC/mL) après incubation 48 h/30°C

*** La sensibilité de la DGGE de moisissures**

L'étude de la sensibilité de la DGGE a été réalisée sur une souche pure de moisissure levure *Aspergillus carbonarius*. L'extraction des acides nucléiques a été réalisée sur des suspensions de spores à différentes concentrations (10^7 à 10^2). L'extraction des ADN est réalisée sur 2 mL de chaque concentration de spores. La quantité et la qualité de l'ADN est vérifié par dosage au nanodrop (Tableau III.6).

Tableau III.6 : Limites de détection de la DGGE sur une culture pure de la moisissure *Aspergillus carbonarius*

Concentration spores/mL	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2
ADN (ng/ μ L)	1070	580	71	23	11	4
Pureté de l'ADN (A_{260}/A_{280})	1.46	1.57	1.88	1.9	2	1.85
Amplification PCR	+	+	+	+	+	+
Sensibilité de la DGGE	+	+	+	+	+	-

Les résultats sont considérés comme positifs quand il y a amplification par PCR, même si une très faible quantité d'ADN a été extraite. La limite de détection est 10^3 spores/mL (Figure III.18). Cette limite est plus faible que celles trouvées par Durand *et al.* (2009) qui annoncent la concentration minimum de 10^4 spores/mL nécessaire pour rendre détectable l'espèce considérée. Ces limites sont pourtant relativement en accord avec d'autres études. Par exemple, Van Elsas *et al.* (2000) annoncent un seuil de détection d'environ 10^3 spores/mL pour *Trichoderma harzianum*. Saad *et al.* (2004) sont eux incapables de détecter moins de 10^5 spores/mL de *Aureobasidium pullulans* et *Epicoccum nigrum*.

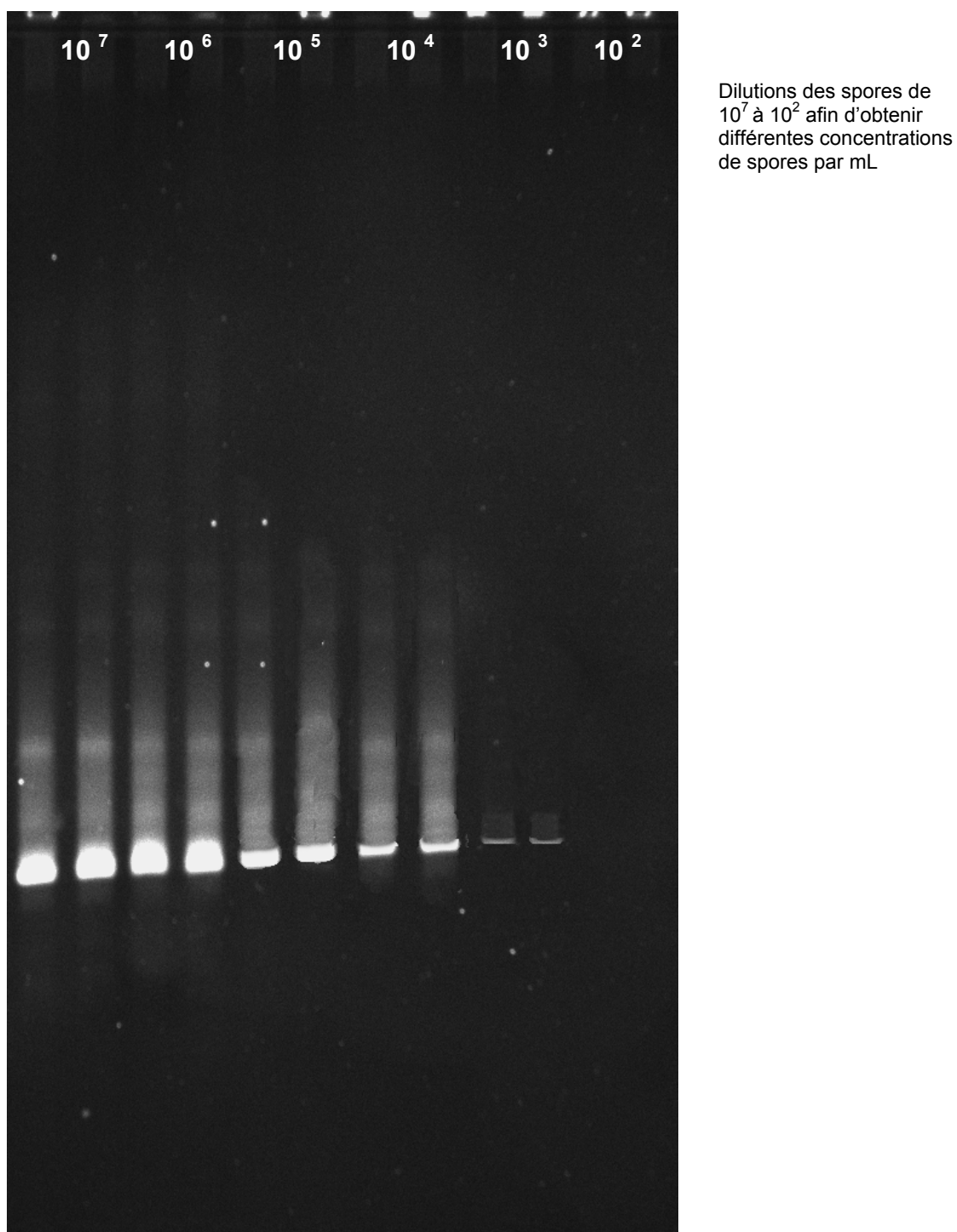


Figure III.18 : Photo de gel de DGGE des différentes concentrations d'*Aspergillus carbonarius* (10^2 – 10^7 spores/mL)

III.2. Application de la PCR-DGGE pour la détermination de l'origine géographique des fruits

Cette étude a pour objectif d'évaluer la capacité de la PCR-DGGE à différencier des fruits de *Physalis* et des fruits de Karité d'origines géographiques différentes et de répondre à l'hypothèse de départ qui consistait à relier la communauté microbienne à l'origine géographiques des aliments .

III.2.1. Analyse de *Physalis* prélevés dans différentes régions

L'échantillonnage a été réalisé au mois de mai 2008. Les échantillons analysés sont des fruits de *Physalis* d'espèces différentes mais prélevés dans différentes régions d'un pays donné. Pour le cas de l'Égypte, les échantillons de fruit de *Physalis* viennent des régions :

- Gouvernement Qalyoubia : Arabe El-Rawshda district, espèce *Physalis ixocarpa* Brot.
- Gouvernement Minufiya : El-Sadate district, espèce *Physalis pubescens* L.
- Gouvernement Beheira : Moderyet El Tahrir district, espèce *Physalis pruinosa* L.
- Gouvernement Alexandrie : Borg El-Arabe district, espèce *Physalis pruinosa* L.

Pour chaque fruit avec ou sans calices, une extraction des ADN totaux a été réalisée suivie de deux amplifications par PCR des levures et des moisissures.

Le gel de vérification de l'extraction des ADN (Figure III.19) permet de voir des bandes intenses et nettes dans les zones de hauts poids moléculaires, et des bandes moins intenses dans les zones de faibles poids moléculaires. Les bandes de hauts poids moléculaires correspondent à celles des fragments de plus de 16 kb qui sont sans doute de l'ADN génomique de la flore microbienne, levures et moisissures combiné à de l'ADN génomique des fruits. L'aspect des bandes obtenues rend compte d'une quantité suffisante d'ADN extrait qui permet de réaliser une amplification par PCR. Ceci démontre l'efficacité de la méthode optimisée au laboratoire pour l'extraction directe des ADN microbiens totaux à partir des fruits.

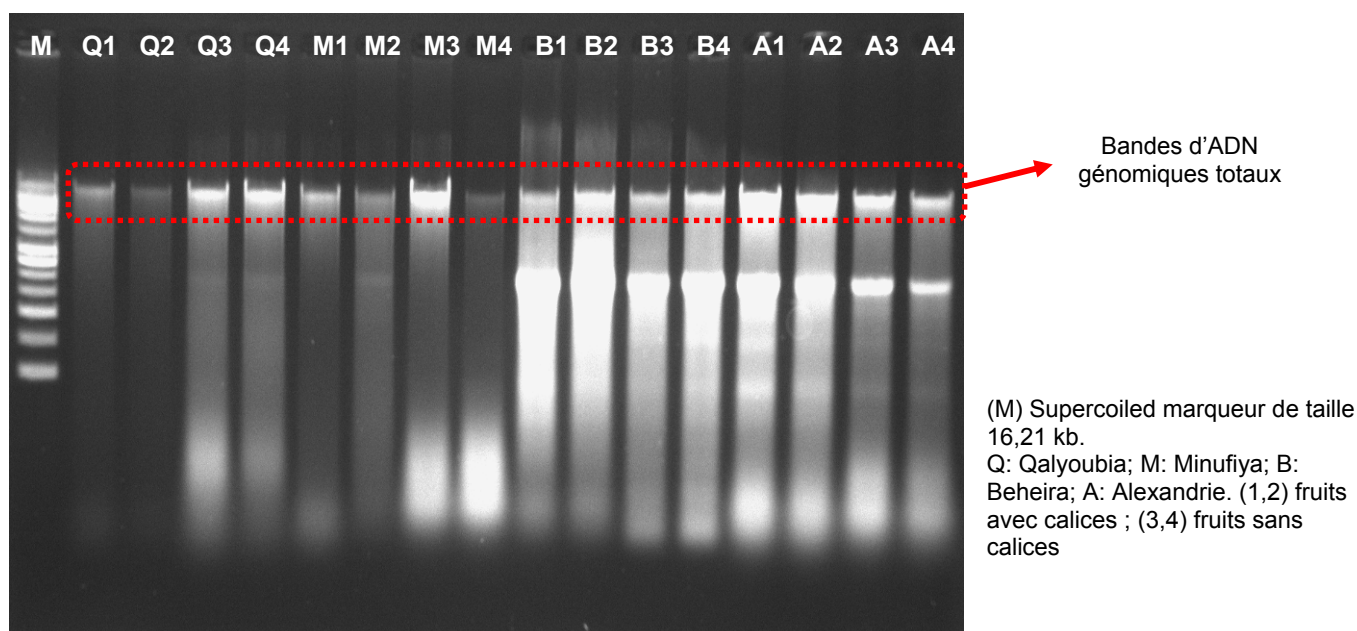


Figure III.19 : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de l'efficacité de l'extraction d'ADN totaux extraits de *Physalis* de différentes origines géographiques

Les résultats de l'amplification par PCR par les amorces GC U1f, U2 de l'ADN des moisissures et GC NL1f, LS2r de l'ADN des levures extraits des souches pures sont visibles sur les figures III.20 et III.21. Sur les gels d'agarose, les produits de PCR donnent des bandes uniques, nettes et intenses situées entre 220 pb et 298 pb, ce qui correspond à la taille attendue qui est de 260 pb pour les moisissures et de 250 pb pour les levures.

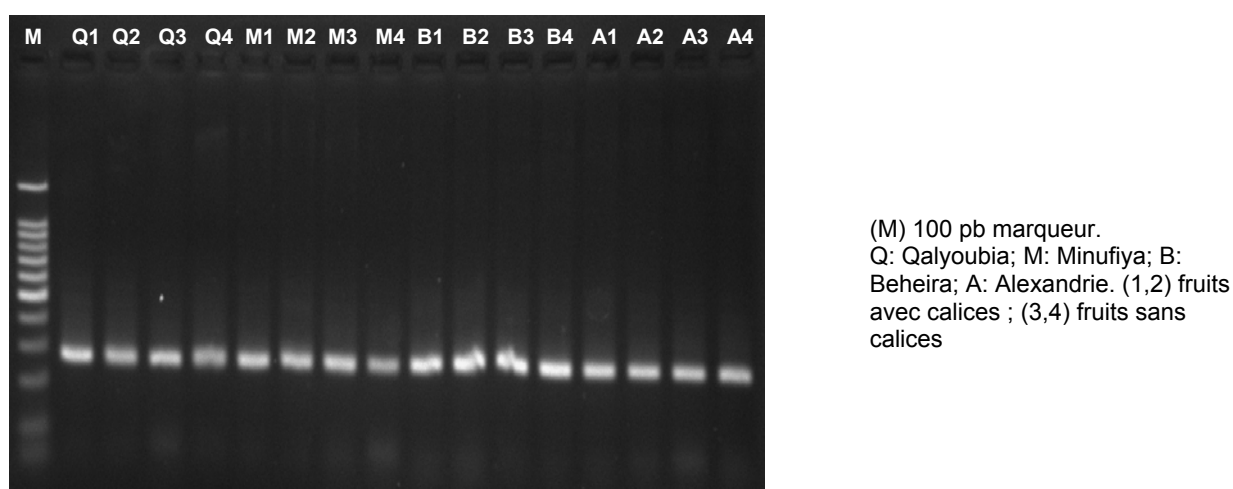


Figure III.20 : Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification d'ADN des levures extraites de *Physalis* de différentes origines géographiques

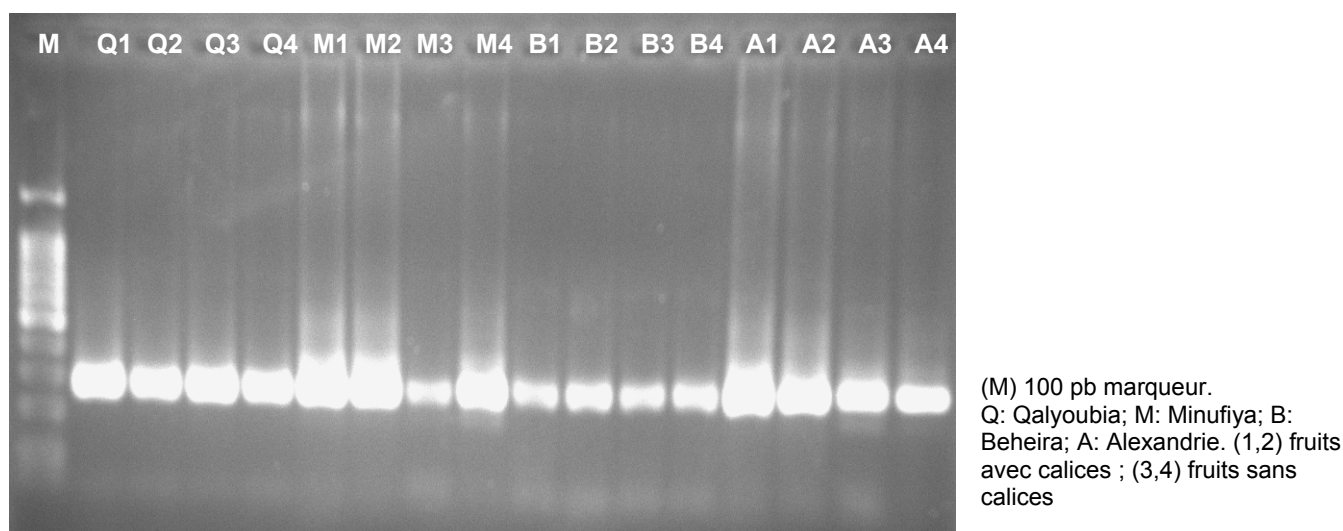


Figure III.21 : Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification d'ADN des moisissures extraites de *Physalis* de différentes origines géographiques

Les résultats obtenus montrent que la qualité et la quantité des ADN totaux extraits des levures et des moisissures sont bonnes et qu'aucun inhibiteur ne semble avoir une influence sur la réaction d'amplification. Les produits de PCR réalisés avec les ADN des levures et des moisissures extraits des fruits de *Physalis* sont ensuite analysés par DGGE.

III.2.1.1. DGGE d'ADN des levures extraites de *Physalis* de différentes régions

Sur le gel, on peut observer que les ADN extraits des deux souches témoins *Wickerhamomyces anomalus* et *Komagataella pastoris* ont donné des bandes intenses et uniques situées aux positions attendues, ce qui confirme le bon déroulement de la DGGE.

Sur le gel, on peut observer 5 à 10 bandes intenses et distinctes pour chaque dépôt (soit chaque fruit). Chaque ligne verticale représente deux fruits et chaque point représente une levure. Les profils DGGE des fruits du *Physalis* avec ou sans calices, provenant de la même région sont identiques et se différencient des profils obtenus avec les fruits d'origines différentes par le nombre et la position des bandes (Figure III.22). Les différences dans les profils peuvent être attribuées à des différences liées à l'environnement entre les régions. Les types de système de traitement appliqués pourraient également influencer sur les communautés levuriennes du *Physalis*. Dans le gel, des groupes communs de levures sont apparus dans tous

les échantillons, indépendamment de la localisation et de la variété. Ces bandes pourraient être des levures communes pour tous les échantillons de *Physalis*. Malgré le nombre restreint de bandes observées, l'analyse factorielle des correspondances (AFC) s'est avérée être un outil statistique utile lorsque l'on compare la similitude des communautés de levure de *Physalis* des quatre régions différentes lors de la saison de récolte. Pour les échantillons de fruits avec et sans les calices, les deux premiers plans à 2 variances décrivent 87,9% et 97,4%, respectivement des variations des données avec une bonne discrimination pour les 4 groupes différents issus des 4 régions différentes, c'est-à-dire les profils des fruits de *Physalis* de Qalyoubia et ceux des autres origines se distinguent clairement (Figure III.23 et III.24). On peut donc conclure que l'ADN des levures peut être utilisé comme marqueur potentiel pour assurer la détermination de l'origine géographique des *Physalis* (El Sheikha *et al.*, 2009a).

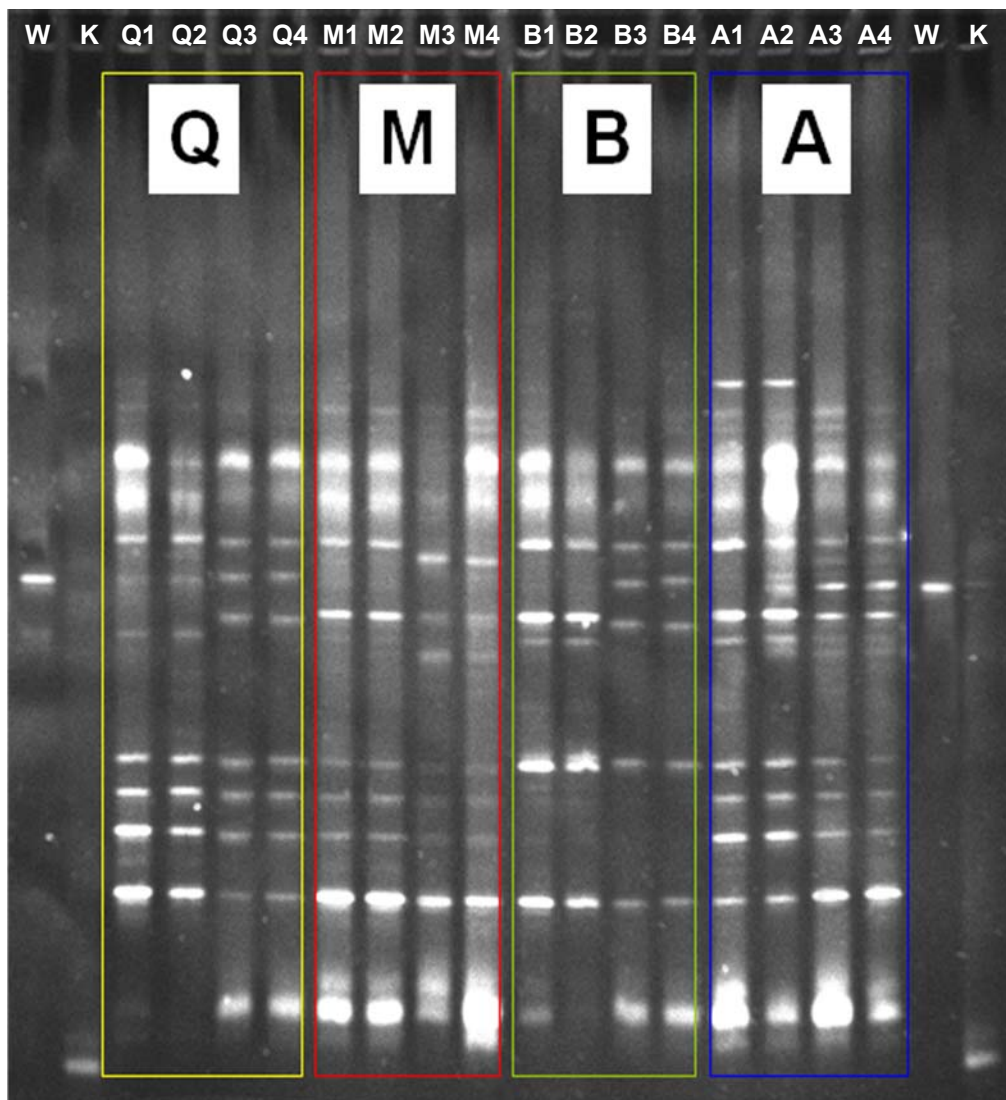
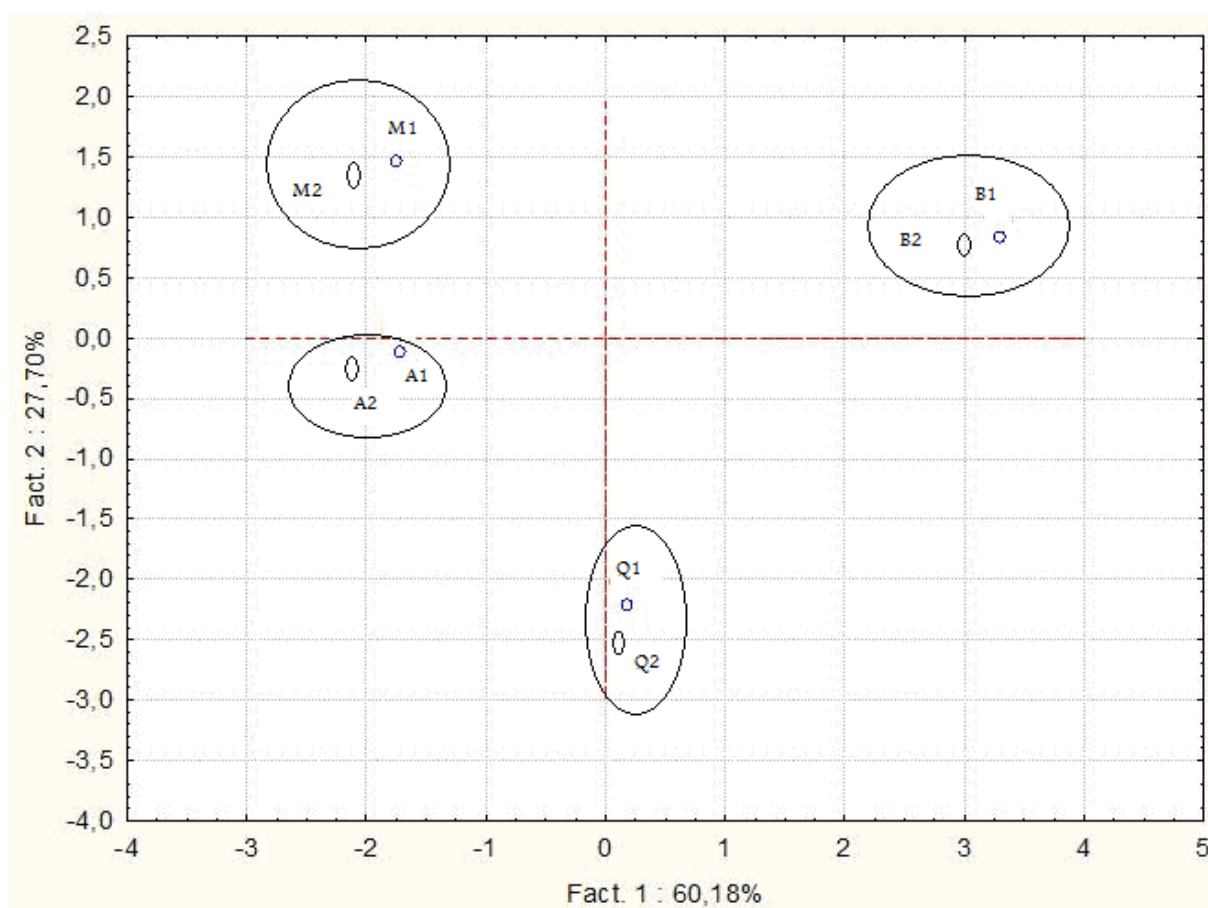
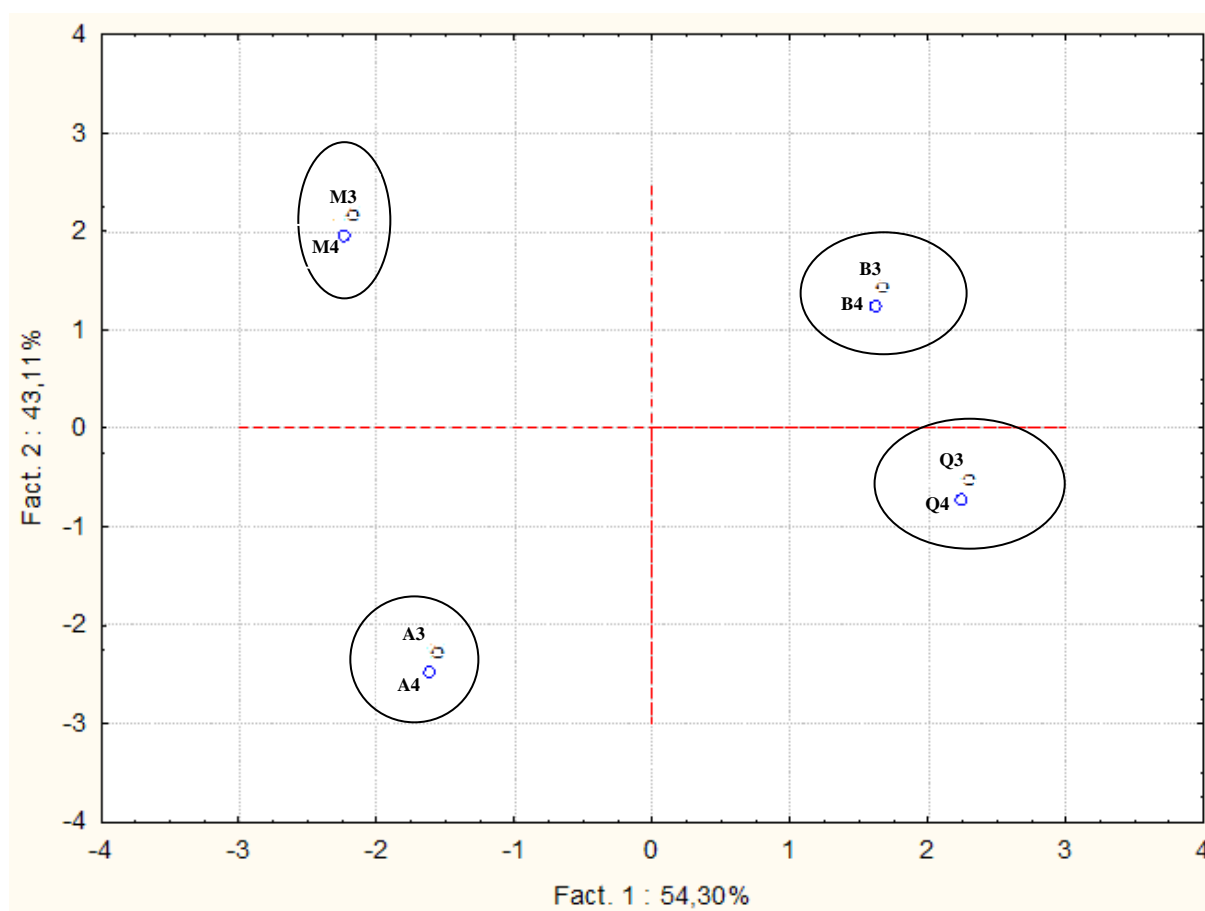


Figure III.22 : Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de *Physalis* de différentes origines géographiques



Q: Qalyoubia; M: Minufiya; B: Beheira; A: Alexandrie. (1,2) fruits avec calices

Figure III.23 : Analyse factorielle des profils DGGE des Physalis avec calice de 4 régions différentes d'Égypte



Q: Qalyoubia; M: Minufiya; B: Beheira; A: Alexandrie. (3,4) fruits sans calices

Figure III.24 : Analyse factorielle des profils DGGE des *Physalis* sans calice de 4 régions différentes d'Égypte

III.2.1.2. DGGE d'ADN des moisissures extraites de *Physalis* de différentes régions

Comme pour les levures, nous avons mis en œuvre la PCR-DGGE pour relier la communauté des moisissures à l'origine géographique des *Physalis*. Sur le gel (Figure III.25), on peut observer que les ADN extraits des deux souches témoins (*Mucor racemosus* et *Trichoderma harzianum*) ont donné des bandes intenses et uniques situées aux positions attendues, ce qui montre le bon déroulement de la DGGE. L'interprétation visuelle des profils DGGE des levures et des moisissures d'après le nombre et la taille des fragments de différence entre les 4 profils électrophorétiques montre qu'il y a une différence entre les profils des différentes régions, mais qui restent cependant assez similaires.

Sur le gel, on peut observer de 6 à 11 bandes intenses et distinctes pour chaque dépôt. Les profils DGGE des fruits du *Physalis* avec ou sans calices,

provenant de la même région sont identiques et se différencient des profils obtenus avec les fruits d'origines différentes par le nombre et la position des bandes. Comme pour l'analyse des levures, chaque ligne verticale représente un fruit et chaque bande représente une moisissure. Les types de système de traitement appliqués en particulier de type fongicide pourraient également influencer sur les communautés fongiques du *Physalis*. Certaines bandes pourraient être des moisissures communes pour tous les échantillons de *Physalis*. Malgré le nombre restreint de bandes observées, l'analyse factorielle des correspondances (AFC) s'est également avérée être le bon outil statistique pour comparer les communautés de moisissures de *Physalis* des quatre régions différentes. Pour les échantillons de fruits avec et sans les calices, le plan à 2 variances décrit 86,9% des variations des données avec une bonne discrimination pour les 4 groupes différents issus des 4 régions différentes. Les profils des fruits de *Physalis* de Qalyoubia et ceux des autres origines se distinguent ici aussi clairement (Figure III.26). L'ADN des moisissures peut donc également être utilisé comme marqueurs potentiels pour assurer la détermination de l'origine géographique des *Physalis* (El Sheikha *et al.*, 2010b).

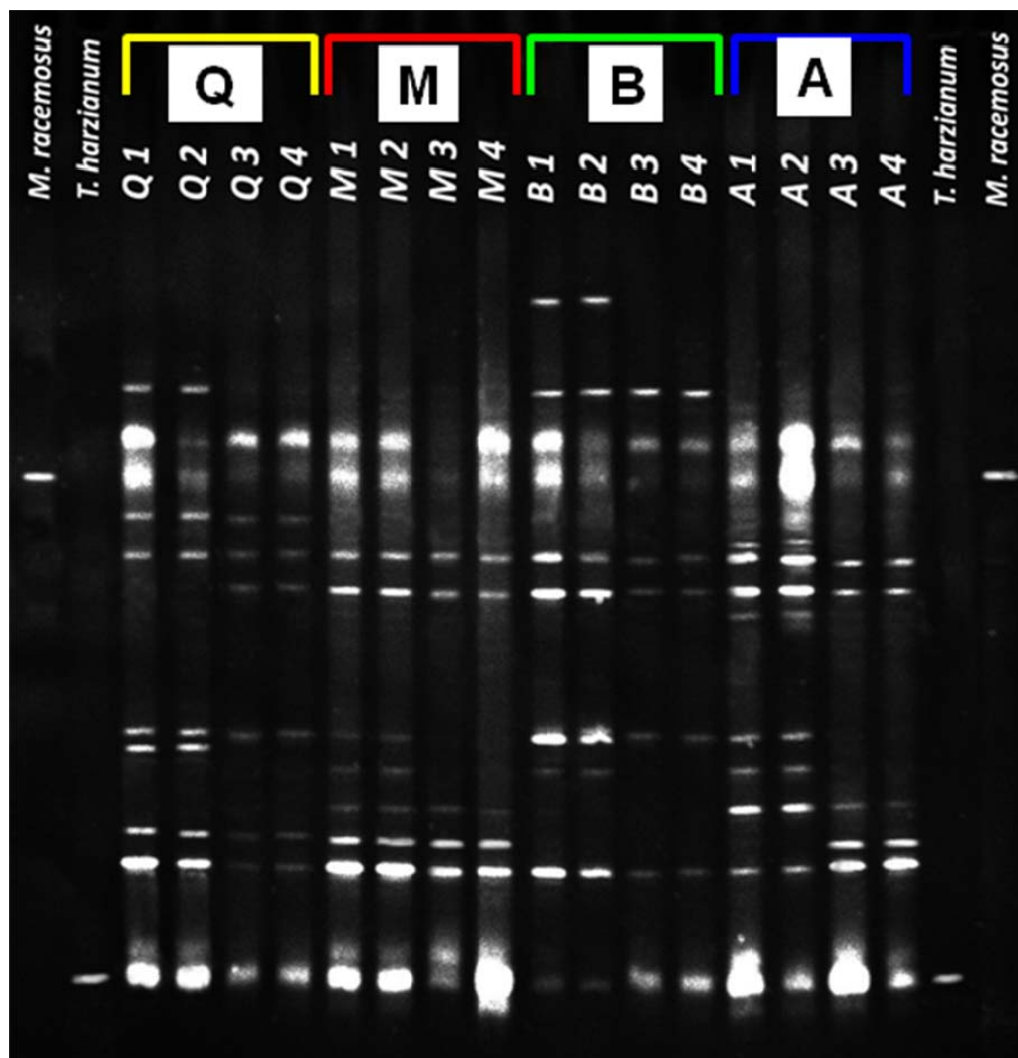
Les résultats obtenus par DGGE sur les fruits de *Physalis* avec calices et sans calices ont montré que :

- 1- Le nombre de bandes obtenues sur les *Physalis* avec calices est un peu supérieur au nombre de bandes des profils DGGE de *Physalis* sans calices mais statistiquement les deux profils sont assez similaires, avec par exemple 96% de similarité pour les profils des moisissures des fruits de Beheira.
- 2- Les analyses statistiques (Figures III.22, III.23 et III.25) montrent que les profils des fruits avec calices ou sans calices ne modifient pas la capacité d'identifier chaque région et différencier les fruits des régions différentes.

Afin d'essayer de comprendre pourquoi les conditions environnementales ont un effet sur la composition microbienne en surface des fruits, nous avons utilisé le logiciel DIVA-GIS version 7.2 (Hijmans *et al.*, 2001) qui permet de décrire les caractéristiques environnementales en utilisant les conditions climatiques actuelles (1950-2000) provenant de la base de données WorldClim climat mondial (Hijmans *et al.*, 2005). La figure III.27 montre que les régions proches géographiquement ont des caractéristiques environnementales voisines. Les régions du nord de l'Égypte

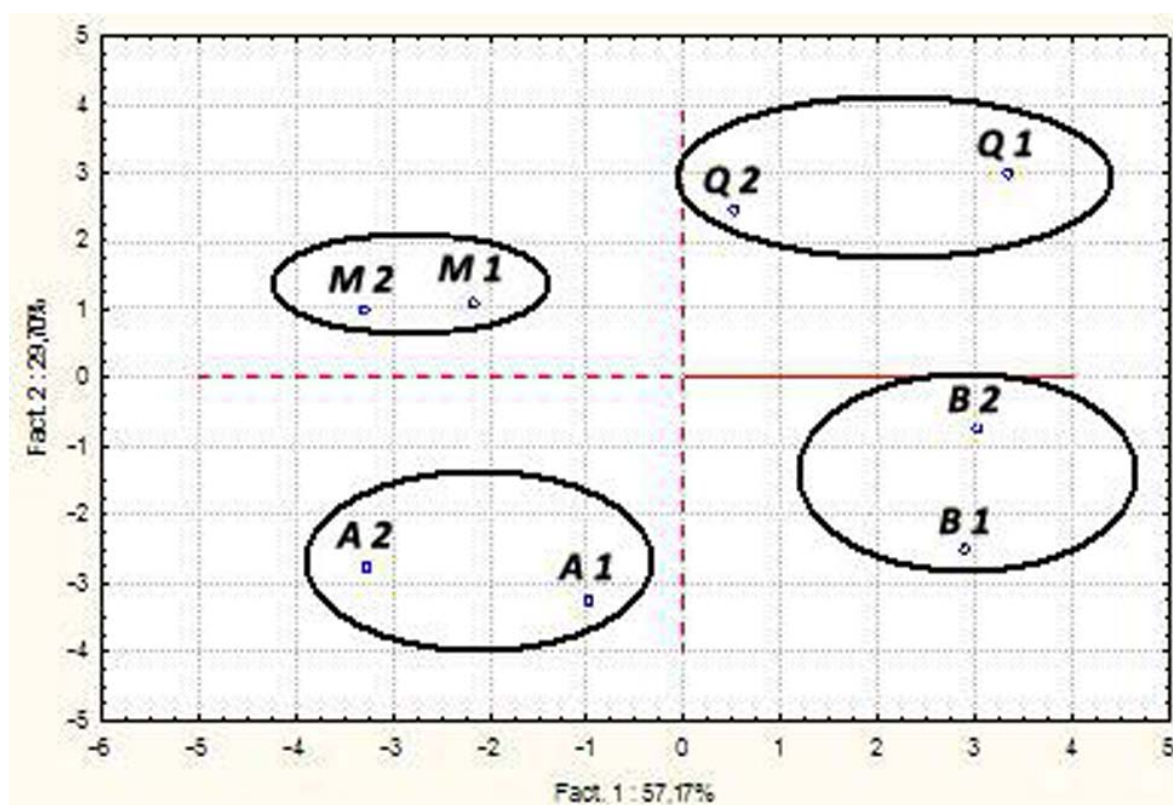
(Alexandrie et Beheira) ont des précipitations plus élevées (avoisinant les 141-211 mm de pluies annuelles) que les régions plus au centre comme Qalyoubia et Minufiya (27-43 mm de pluies annuelles). On constate que les profils DGGE des échantillons du *Physalis* provenant d'Alexandrie et Beheira se regroupent dans un même cluster avec 16% et 15% de dissimilarité pour les levures et les moisissures, alors que les profils des fruits du *Physalis* d'Qalyoubia et Minufiya se regroupent avec 14% et 13% de dissimilarité pour les levures et les moisissures.

Enfin, on peut conclure que les différences environnementales entre les régions où les fruits de *Physalis* ont été récoltés ont un effet majeur sur la communauté des levures et des moisissures.



Q: Qalyoubia; M: Minufiya; B: Beheira; A: Alexandrie. (1,2) fruits avec calices ; (3,4) fruits sans calices

Figure III.25 : Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de *Physalis* de différentes origines géographiques



Q: Qalyoubia; M: Minufiya; B: Beheira; A: Alexandrie. (1) fruits avec calices ; (2) fruits sans calices

Figure III.26 : Analyse factorielle des profils DGGE de Physalis avec et sans calice de 4 régions différentes d'Égypte

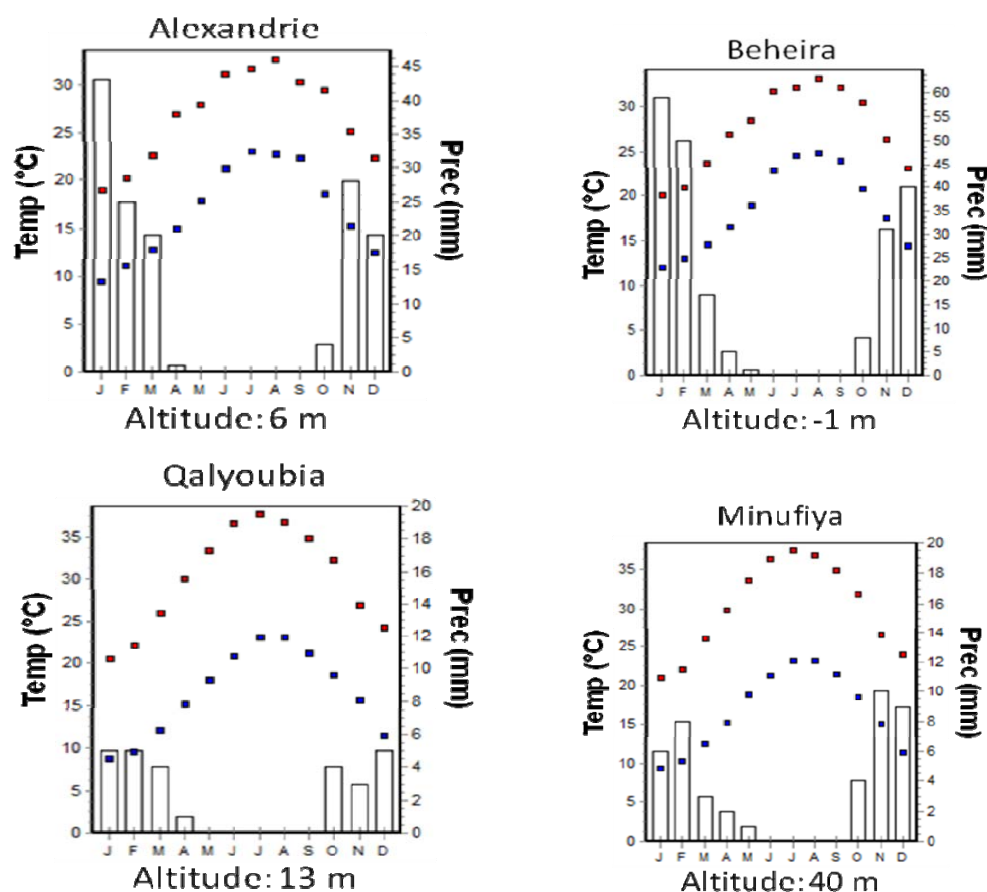


Figure III.27 : Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte en utilisant la base de données WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005)
Temp = température, **Prec** = précipitations

III.2.2. Analyse de Karité prélevés dans différentes régions africaines

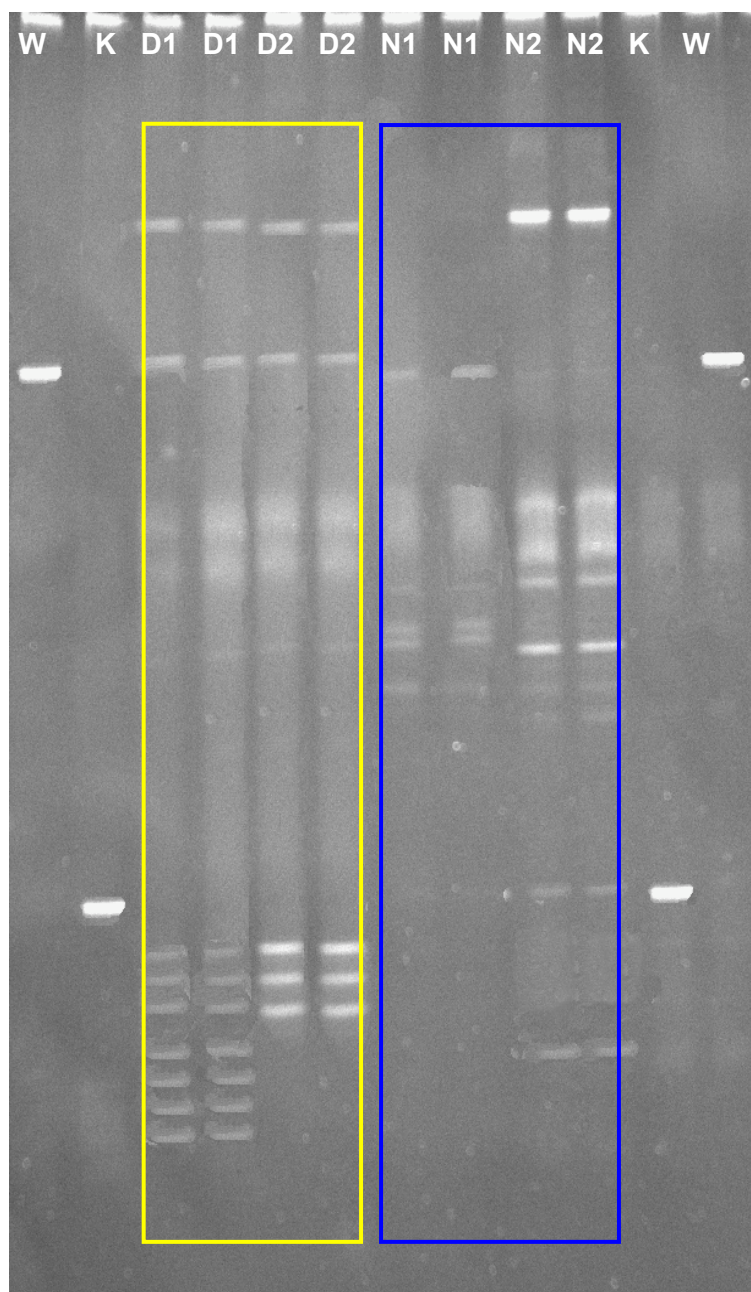
L'échantillonnage a été réalisé au mois de juillet 2008. Les échantillons analysés sont des fruits de Karité prélevés dans différentes régions d'un même pays. Ils viennent dans ce cas de différentes régions du Mali :

- Région Ségou : Village Daelan.
- Région Sikasso : Village Nafégué.

III.2.2.1. DGGE d'ADN des levures extraites de Karité de différentes régions du Mali

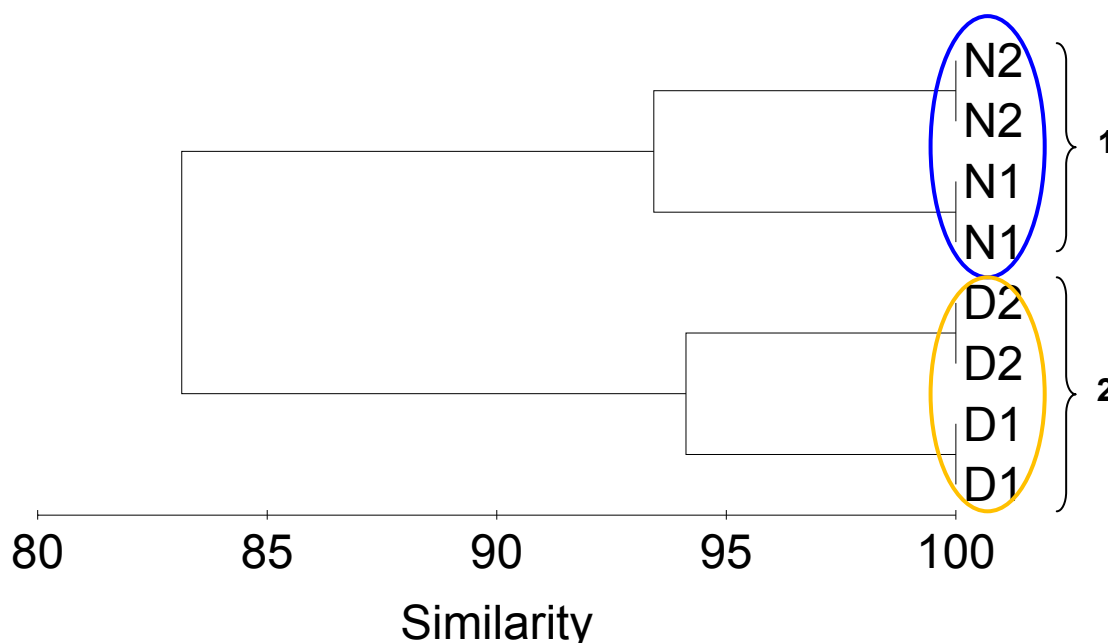
Comme pour le *Physalis*, la DGGE s'est bien déroulée comme le montrent le positionnement de l'ADN des deux souches témoins *Wickerhamomyces anomalus* et *Komagataella pastoris*. Sur le gel, on peut observer de 6 à 11 bandes intenses et distinctes pour chaque dépôt.

Les profils DGGE des fruits du Karité, provenant de la même région sont identiques (Figure III.28). Au niveau de similarité de 83%, deux groupes principaux ont été observés : le premier groupe comprend les échantillons de la région Sikasso, le deuxième groupe comprend les échantillons de la région de Ségou (Figure III.29). Il est rassurant de constater que les deux districts « D1 et D2 » et « N1 et N2 » de chaque région sont plus proches entre eux (similarité de 94%) qu'entre les régions (similarité de 83%).



W: *Wickerhamomyces anomalus*;
K: *Komagataella pastoris*;
D1, D2 : 2 districts dans le village Daelan de la région Ségou;
N1, N2 : 2 districts dans le village Nafégué de la région Sikasso

Figure III.28 : Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Karité de différentes origines géographiques du Mali



D1, D2 : 2 districts dans le village Daelan de la région Ségou; N1, N2 : 2 districts dans le village Nafégué de la région Sikasso

Figure III.29 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraits de Karité prélevés de 2 régions différentes du Mali

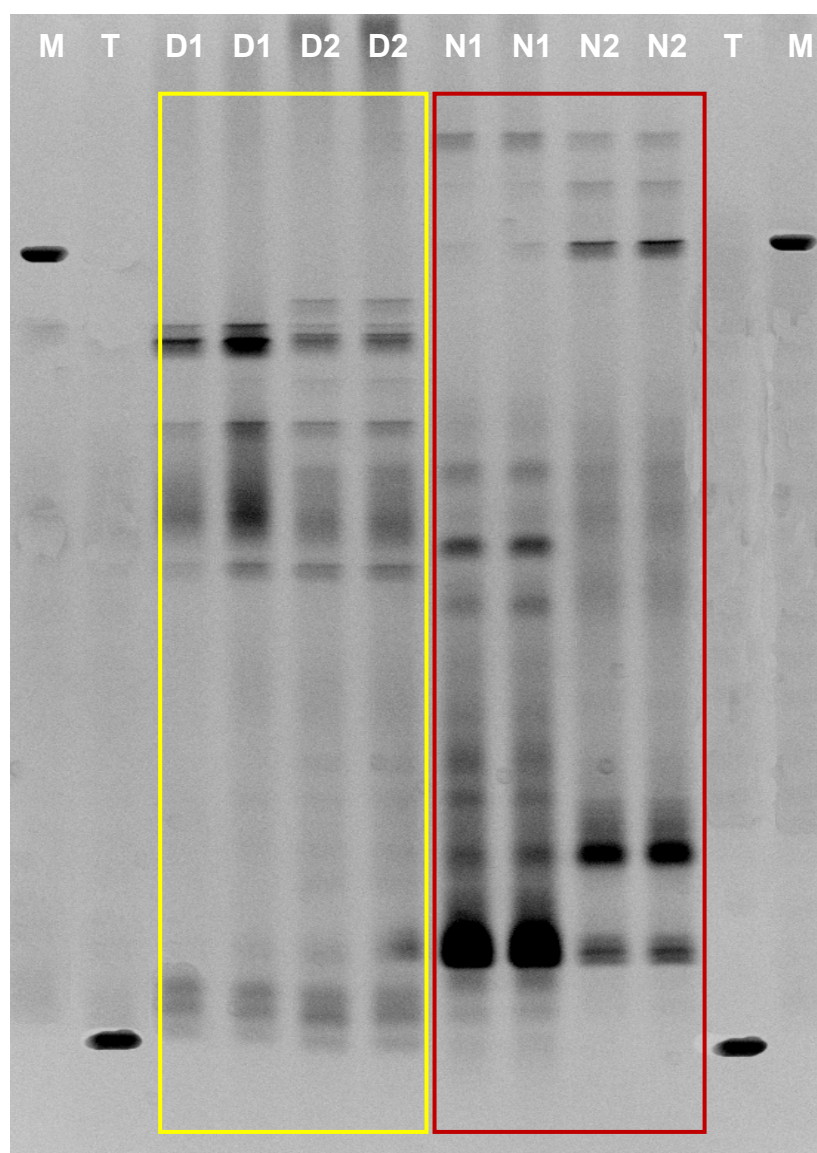
III.2.2.2. DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité de différentes régions du Mali

La DGGE s'est bien déroulée comme le montre le positionnement de l'ADN des deux souches témoins *Mucor racemosus* et *Trichoderma harzianum*.

Sur le gel, on peut observer de 8 à 12 bandes intenses et distinctes pour chaque dépôt. Les profils DGGE des fruits du Karité, provenant de la même région sont identiques (Figure III.30). Certaines bandes sont communes pour tous les échantillons de Karité. Au niveau de similarité de 67%, deux groupes principaux se différencient : le premier groupe comprend les échantillons de la région Ségou, le deuxième groupe comprend les échantillons de la région Sikasso (Figure III.31). Les deux districts d'une même région sont également plus similaires (92%) que les deux régions dont la similarité est plus faible (67%).

Comme pour le *Physalis*, nous pouvons confirmer qu'il y a suffisamment des différences environnementales entre les régions où les fruits de Karité ont été récoltés (Figure III.32) pour obtenir un effet majeur sur la communauté des levures et des moisissures. En effet la région de Nafégué est plus arrosée avec 1225 mm de

pluie annuelle que la région de Daelan avec 683 mm de pluie annuelle. Nous pouvons donc créer un lien statistique entre les populations de levures et de moisissures et les zones géographiques.



M: *Mucor racemosus*;
T: *Trichoderma harzianum*;
D1, D2 : 2 districts dans le village Daelan de la région Ségou;
N1, N2 : 2 districts dans le village Nafégué de la région Sikasso

Figure III.30 : Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité de deux origines géographiques du Mali

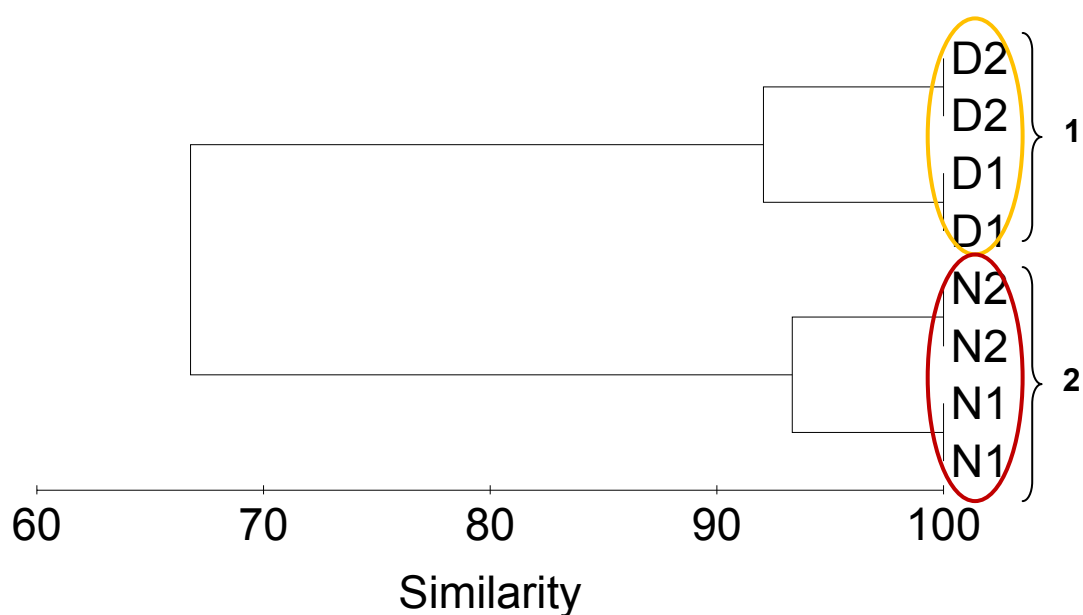


Figure III.31 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité prélevés de 2 régions différentes du Mali

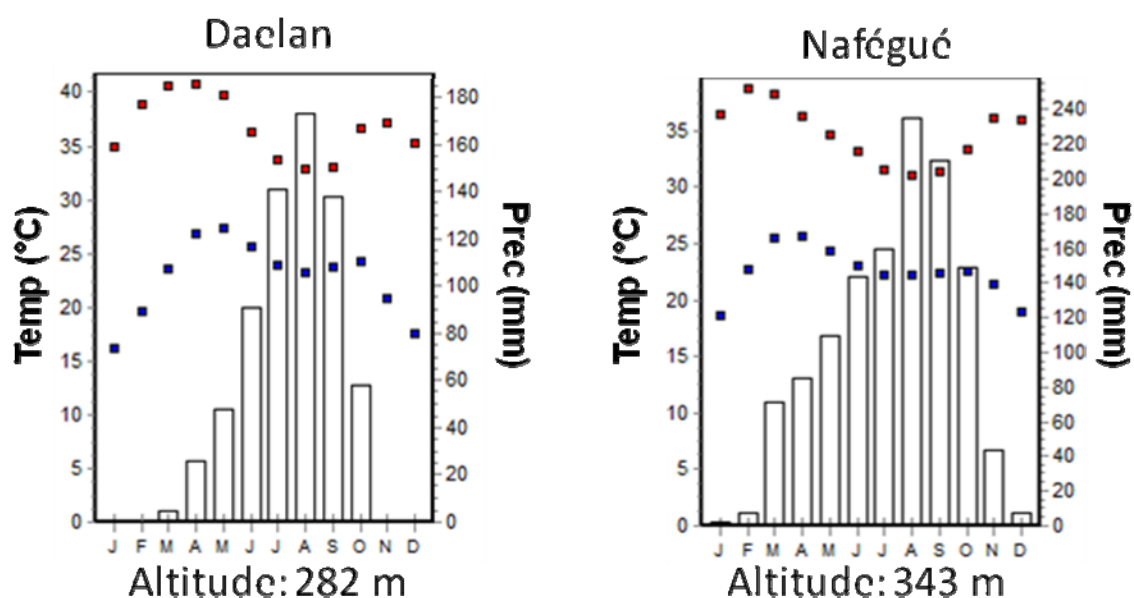


Figure III.32 : Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle) des sites de récolte de Karité prélevés de 2 régions différentes du Mali

III.2.3. Analyse de Karité de différents districts de la région de Tambacounda au Sénégal

L'échantillonnage a été réalisé au mois de juillet 2008. Nous avons montré que la PCR-DGGE permettait de différencier des fruits prélevés dans des zones géographiques relativement éloignées. Nous avons voulu savoir si cette différenciation était possible pour des fruits prélevés dans des zones géographiques rapprochées.

Les fruits de Karité utilisés pour cette étude, ont été prélevés dans 3 districts différents que sont les districts de Saraya, Samécouta, et de Kenioto de la région de Tambacounda au Sénégal.

Sur les gels DGGE des amplicons d'ADN des levures et des moisissures, des bandes nettes et bien distinctes sont observées (Figures III.33 et III.34). Le nombre des bandes des profils DGGE des fruits des districts différents varie de 3 à 6 bandes pour les levures et 4 à 9 bandes pour les moisissures. L'observation des gels DGGE permet de dire que les profils d'ADN des levures et des moisissures extraits des fruits de Karité d'un même district sont très similaires tant par la position des bandes que par leur intensité. Les fruits des districts différents ont des profils DGGE différents.

L'analyse statistique des profils DGGE des fruits de Karité montre une similarité importante entre les différentes localisations de la même région où les fruits de Karité ont été collectés. A 84% de similarité pour les levures, 2 principaux clusters sont observés : le premier cluster contient des échantillons du district de Saraya ; le deuxième cluster contient les échantillons des districts de Samécouta et de Kenioto. La communauté levurienne du district de Saraya est étroitement liée avec 95% de similarité, ainsi que la communauté levurienne des districts de Samécouta et de Kenioto avec 96% de similarité (Figure III.35). A 89% de similarité pour les moisissures, 2 principaux clusters sont observés: le premier cluster contient des échantillons du district de Saraya et de Kenioto ; le deuxième cluster contient les échantillons des districts de Samécouta (Figure III.36). La communauté de moisissures des districts de Saraya et de Kenioto avec 94%, ainsi que la communauté de moisissure de Saraya est étroitement liée avec 96% de similarité.

L'analyse de similarité a montré une similarité de 84% pour les levures et une similarité de 90% pour les moisissures pour tous les districts de la même région d'Tambacounda. On peut dire qu'il existe un profil type des levures (El Sheikha,

2010) et un profil type des moisissures pour cette région. Ces profils pourront servir d'identité pour cette région lors de la comparaison avec d'autres régions.

La figure III.37 montre que les districts de la même région d'Tambacounda, qui sont proches géographiquement ont logiquement des caractéristiques environnementales similaires. Les précipitations pour Saraya sont de 1015 mm, Kenioto 1102 mm et Samécouta 1087 mm de pluie annuelle. Il faut donc conclure grâce à cette étude que d'autres paramètres autres qu'environnementaux ont un effet sur la composition qualitative des flores microbiennes. On peut penser par exemple aux pratiques agricoles ou à des facteurs environnementaux que l'on ne maîtrise pas comme la présence d'usine ou la pollution.

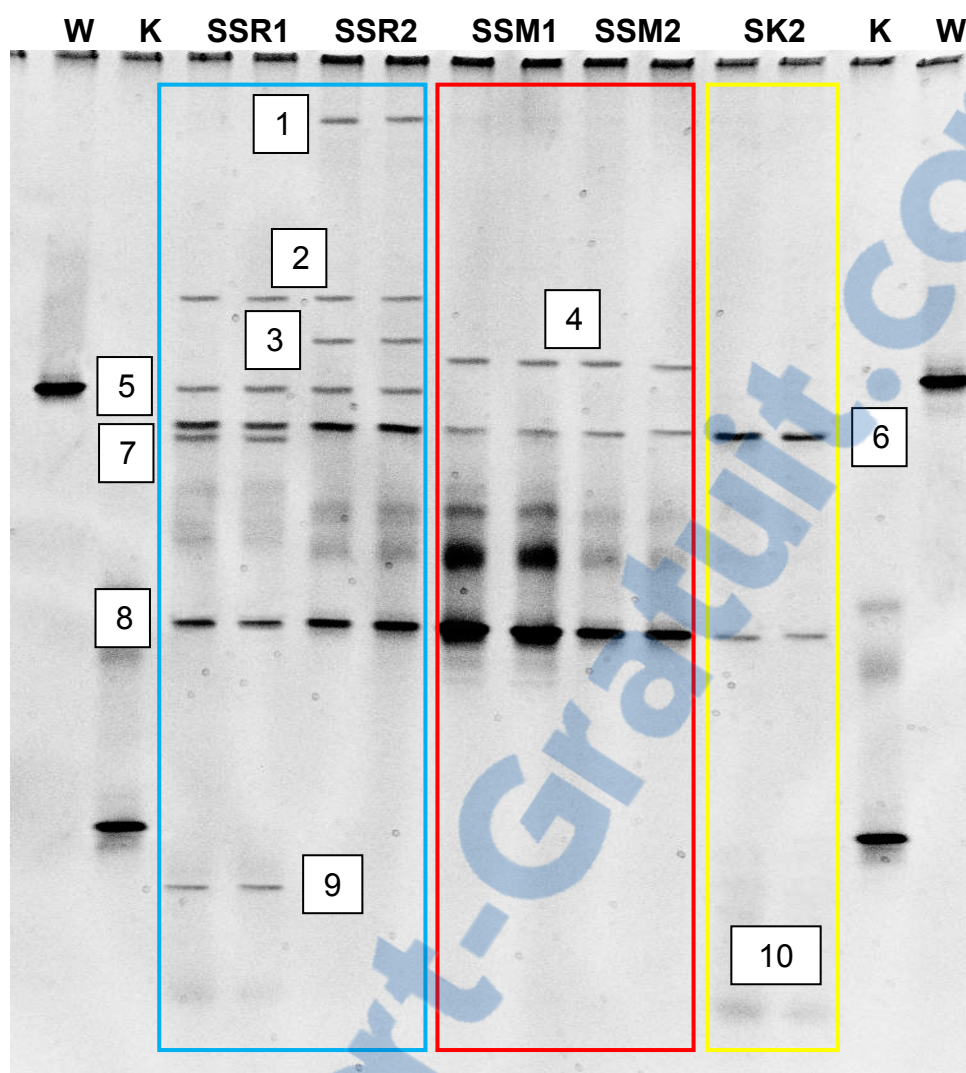


Figure III.33 : Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

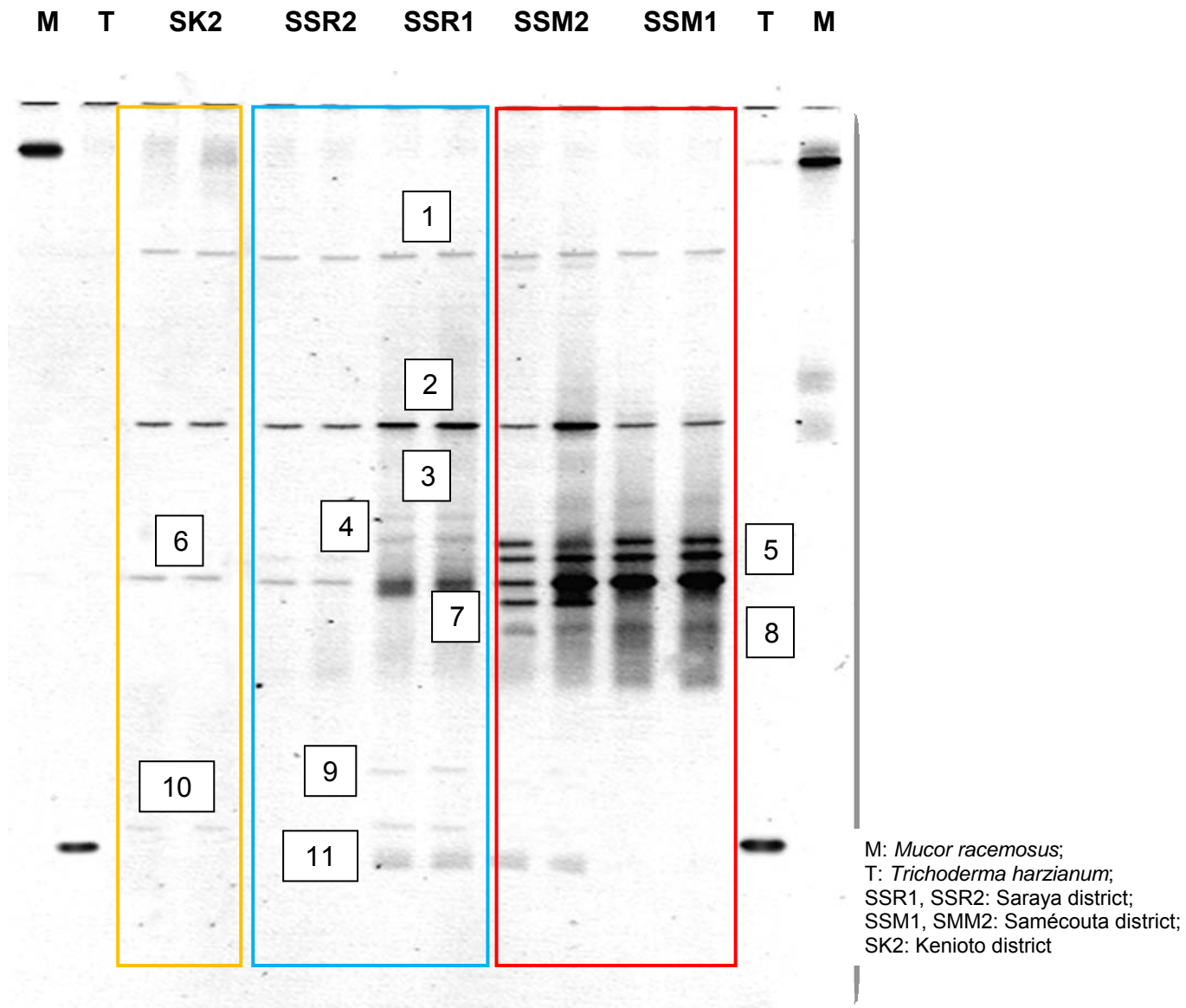


Figure III.34 : Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

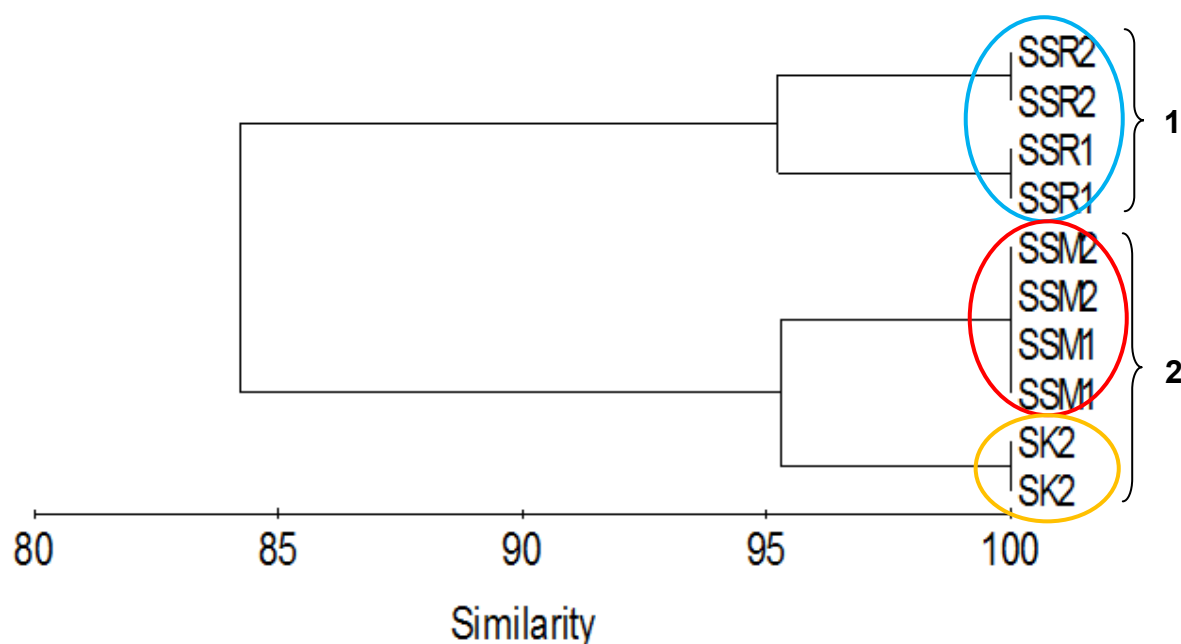


Figure III.35 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

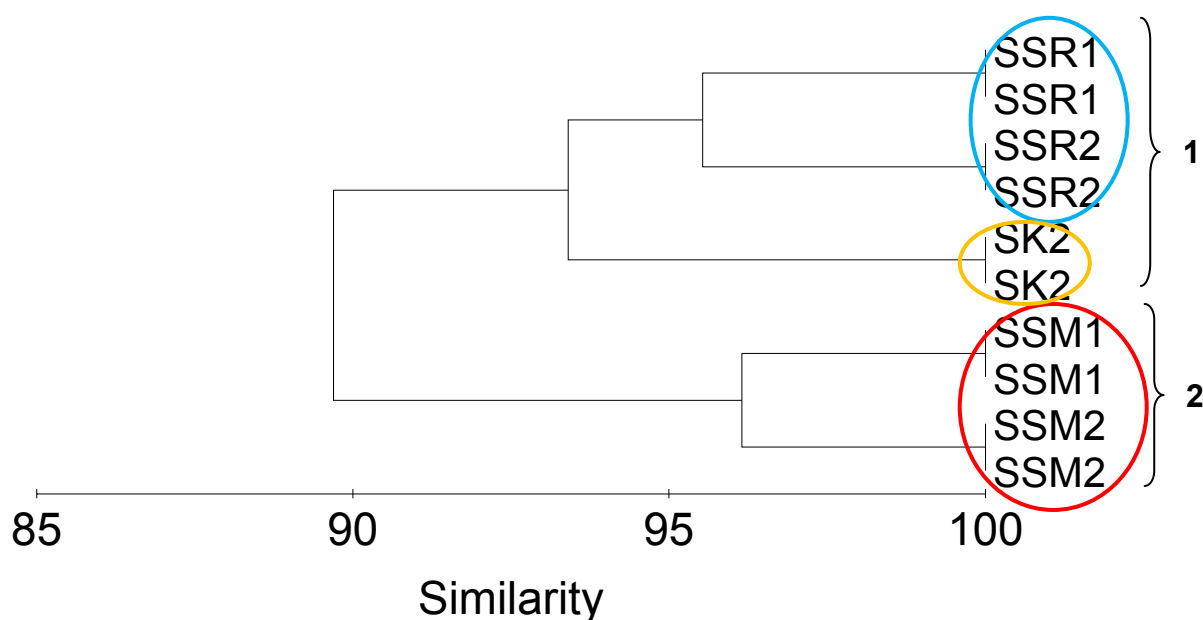


Figure III.36 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

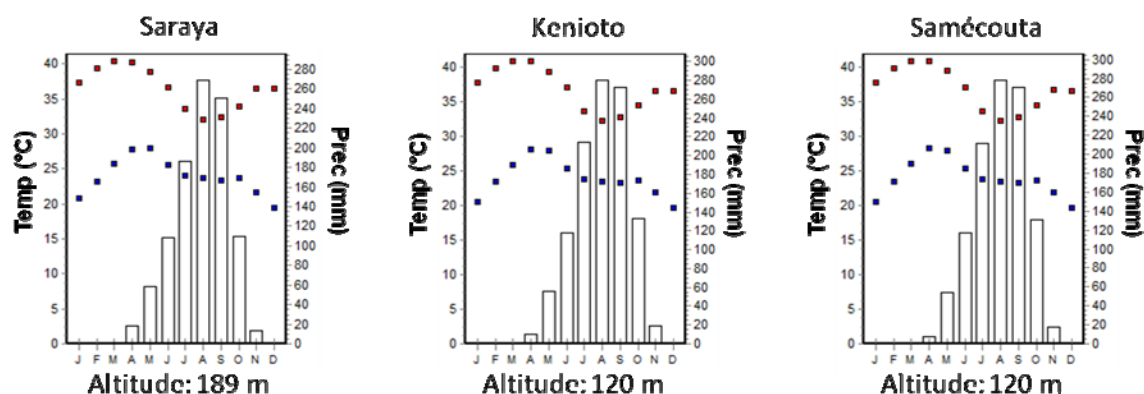


Figure III.37 : Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

III.2.4. Comparaison de la totalité des profils DGGE des fruits de différentes origines géographiques

L'utilisation de la PCR-DGGE pour caractériser globalement les flores des levures et des moisissures des fruits de *Physalis* et de Karité afin d'en déterminer l'origine géographique a conduit à une multitude de profils différents. Nous avons voulu savoir comment ces profils se différenciaient lors d'une analyse des combinaisons de ces profils issus de *Physalis* et de Karité de pays différents.

*III.2.4.1. Analyse de *Physalis* de Colombie, d'Ouganda et d'Égypte*

L'échantillonnage a été réalisé au mois de mai 2008. Les échantillons analysés sont des fruits de *Physalis* prélevés dans différents pays :

Colombie

- Région Bogotá : Usaqué district, espèce *Physalis peruviana* L.
- Région Sabana : Cota Cundinamarca district, espèce *Physalis peruviana* L.

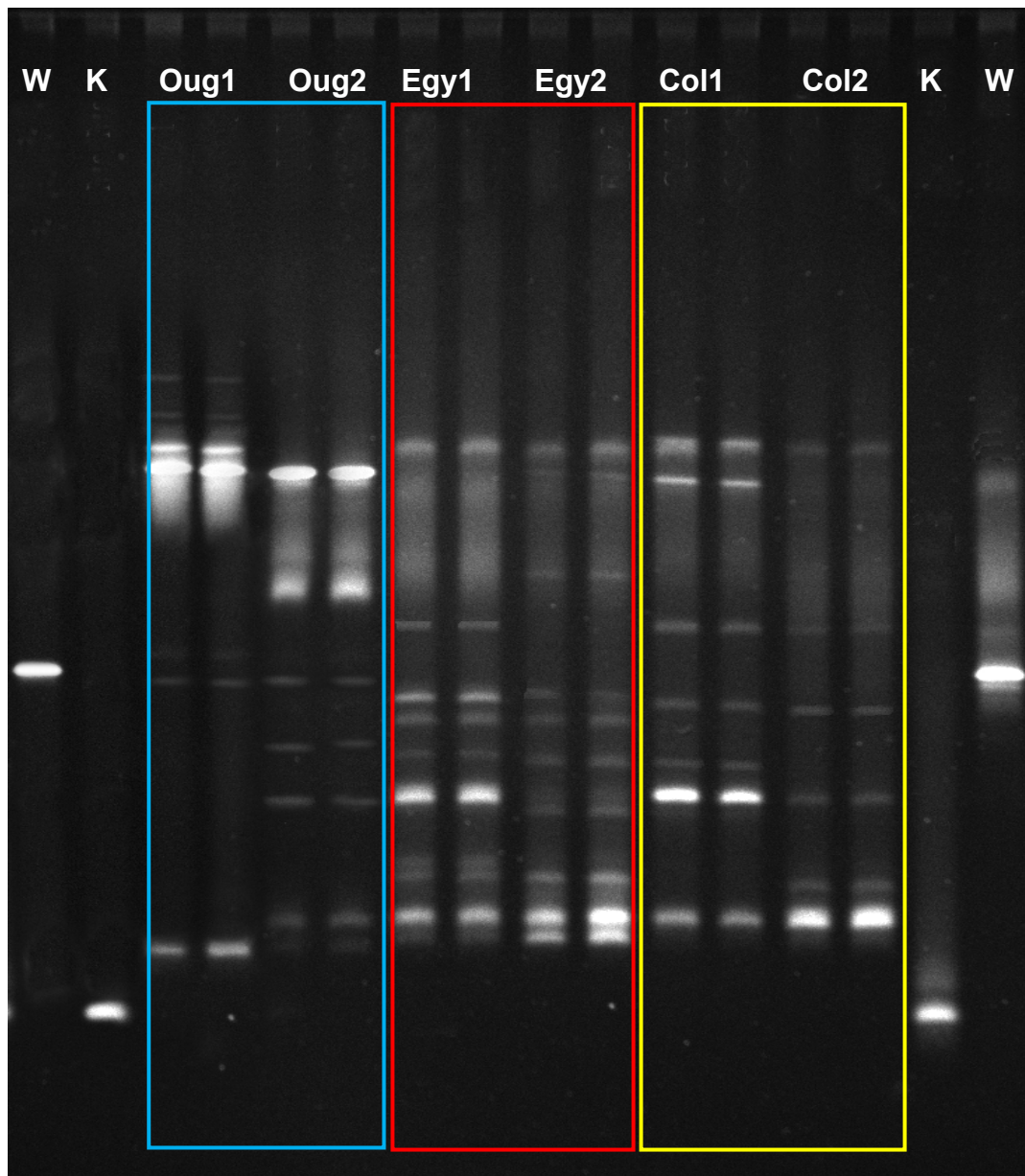
Ouganda

- Région Centrale : Kawempe district, espèce *Physalis peruviana* L.
Mukono district, espèce *Physalis peruviana* L.

Égypte

- Gouvernement Qalyoubia : Arabe El-Rawshda district, espèce *Physalis ixocarpa* Brot.
- Gouvernement Minufiya : El-Sadate district, espèce *Physalis pubescens* L.

DGGE d'ADN des levures : Le nombre des bandes des profils de DGGE dans chaque piste, c'est-à-dire pour chaque fruit, varie de 10 à 11 bandes pour les *Physalis* d'Égypte, de 6 à 7 bandes pour ceux de Colombie et est de 7 bandes pour les *Physalis* d'Ouganda. L'observation du gel de DGGE permet de dire que le duplicata des profils de DGGE d'ADN levurien extrait des fruits de *Physalis* pour chaque district ont été similaires intra-pays (Figure III.38). La duplication de l'analyse d'un échantillon n'a jamais donné de changements dans le profil obtenu pour les deux types de microorganismes (identique). À 78% de similarité, deux groupes principaux ont été observés : le premier groupe comprend les échantillons en provenance d'Ouganda, le deuxième groupe comprend les échantillons provenant de Colombie et d'Égypte. L'analyse typologique montre également différents niveaux de similitudes entre les différents pays. Les similitudes entre les districts sont de 86-96% plus fortes que les similitudes entre les pays (79-87%) (Figure III.39). Par exemple, il existe une similarité statistique de 87% entre la Colombie et l'Égypte, ce qui ne veut pas dire que l'on a affaire systématiquement aux mêmes espèces de souches microbiennes. Certaines souches sont cependant communes et sont donc liées à la communauté du fruit lui-même.



W: *Wickerhamomyces anomalus*; K: *Komagataella pastoris*; Oug: Ouganda; Egy: Égypte; Col: Colombie. (1, 2) Régions différentes

Figure III.38 : Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de *Physalis* d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie

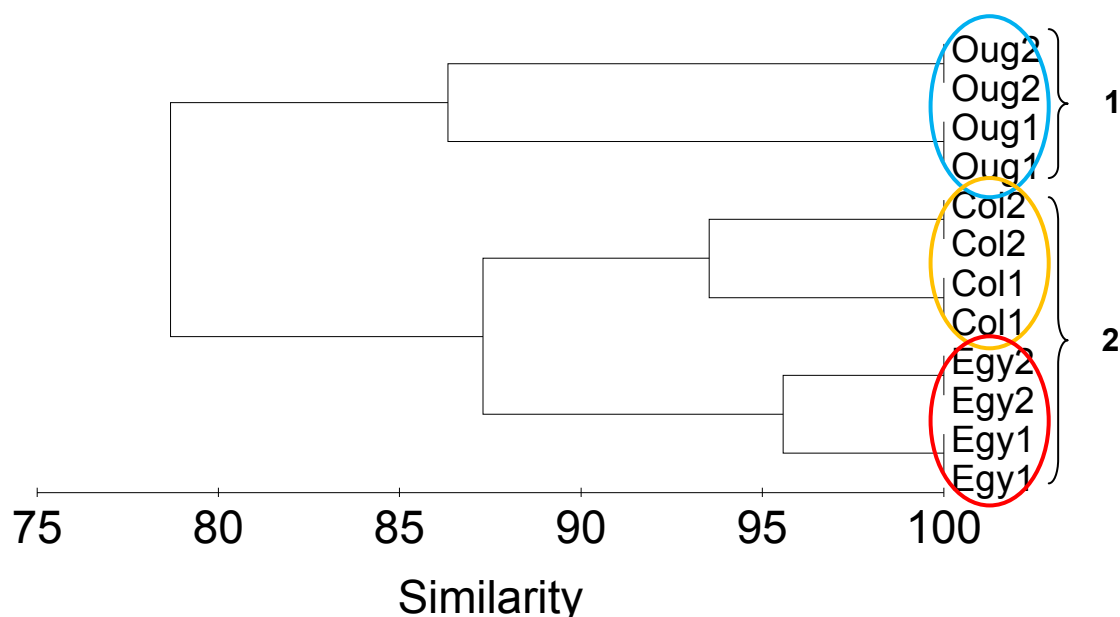
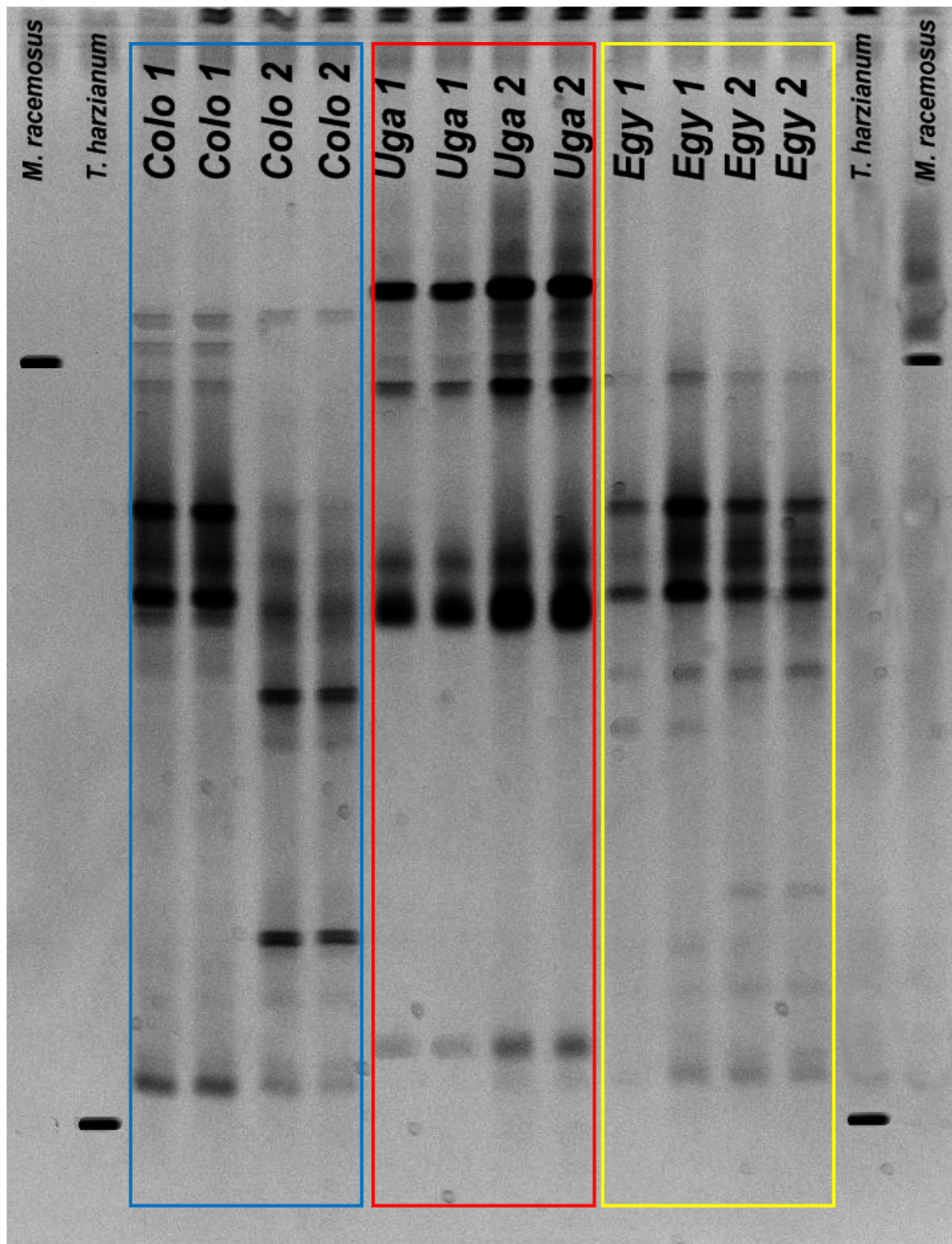


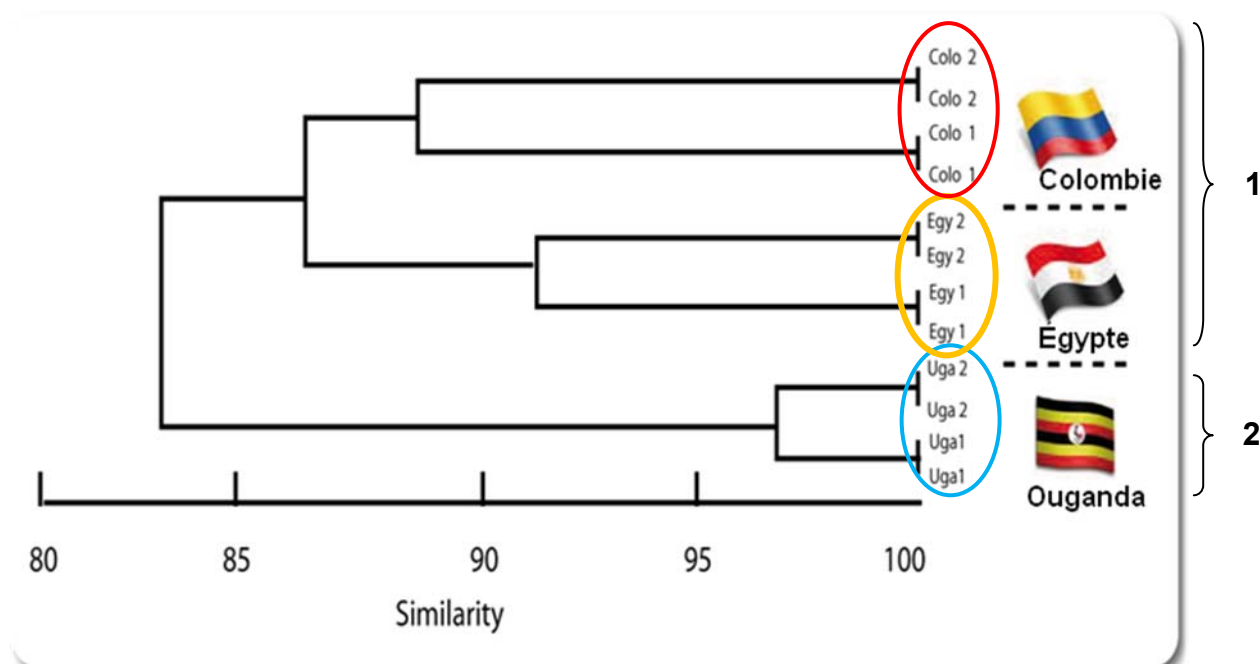
Figure III.39 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraites de Physalis d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie

DGGE d'ADN des moisissures : Sur le gel de DGGE, le nombre des bandes des profils de DGGE pour chaque piste varie de 8 à 9 bandes pour les Physalis d'Égypte, de 8 bandes pour ceux de Colombie et est de 7 à 8 bandes pour les Physalis d'Ouganda. L'observation du gel de DGGE permet de dire que les duplicata des profils de DGGE d'ADN de moisissures extraites des fruits de Physalis pour chaque district sont similaires pour chacun des pays (Figure III.40). À 83% de similarité (Figure III.41), deux groupes principaux ont été observés : le premier groupe comprend les échantillons provenant de Colombie et d'Égypte, le deuxième groupe comprend les échantillons en provenance d'Ouganda (El Sheikha et Montet, 2010).



Uga: Ouganda; Egy: Égypte; Colo: Colombie. (1, 2) Régions différentes

Figure III.40 : Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de *Physalis* d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie



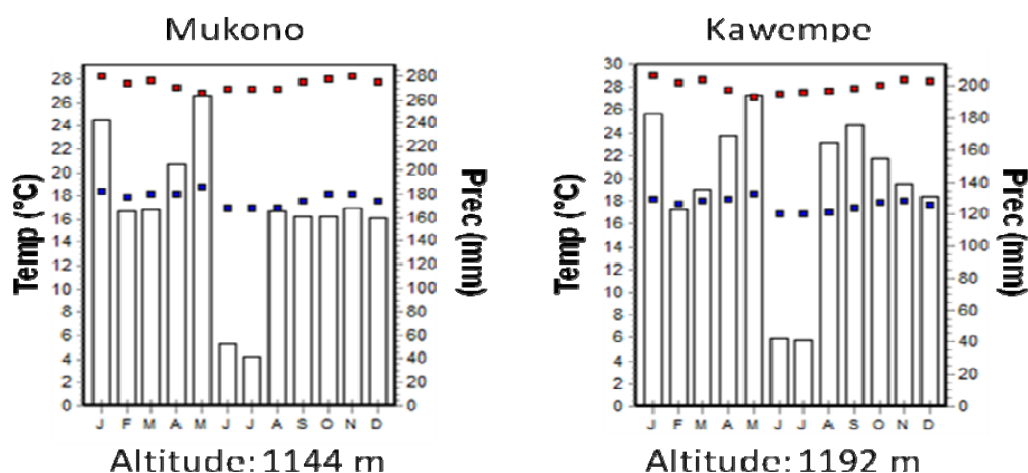
Uga: Ouganda; Egy: Égypte; Colo: Colombie. (1, 2) Régions différentes

Figure III.41 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Physalis d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie

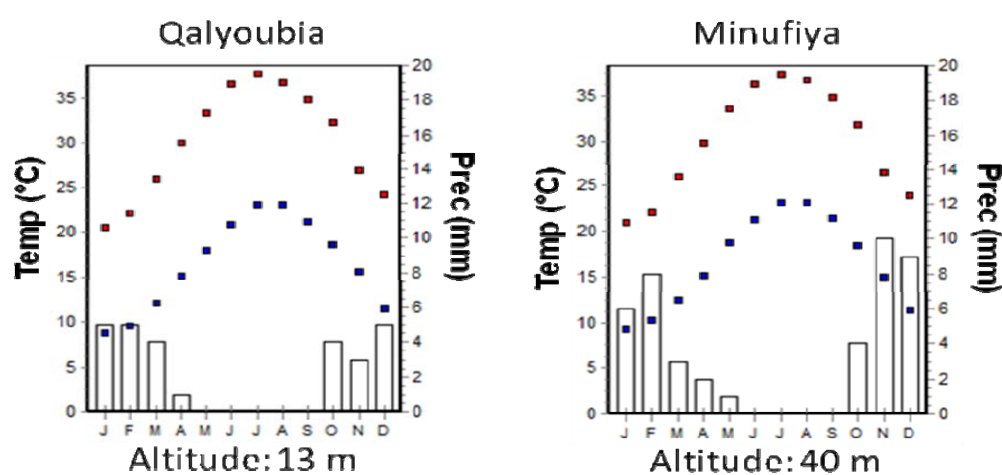
Les profils de DGGE d'ADN de levures et de moisissures d'Ouganda sont très différents de ceux d'Égypte et de la Colombie. Les analyses statistiques (Figures III.39 et III.41) confirment nos observations, à savoir que les Physalis issus d'un même pays se regroupent dans un même cluster avec 96% pour la DGGE de levure de Physalis d'Égypte, 94% pour ceux de la Colombie et 86% pour ceux d'Ouganda. Pour la DGGE de moisissures, les Physalis du même pays se regroupent aussi dans un même cluster avec 96% pour le Physalis d'Ouganda, 91% pour ceux d'Égypte et 88% pour ceux de la Colombie.

En fait, en regardant les différentes localisations de prélèvements d'échantillons (Figures II.5, II.6 et II.7 dans la partie Matériels et Méthodes) on peut conclure que les variations des conditions environnementales sont nettes entre les pays (Figure III.42), ce qui aurait un impact sur la détermination des types et la croissance des micro-organismes qui peuvent être présents dans chacune de ces conditions environnementales (Stolp, 1988). Ces différences environnementales sont soit les différences d'altitude, de température ou de pluviométrie des régions où les fruits de Physalis ont été récoltés (Tableau III.7).

(A) Ouganda



(B) Égypte



(C) Colombie

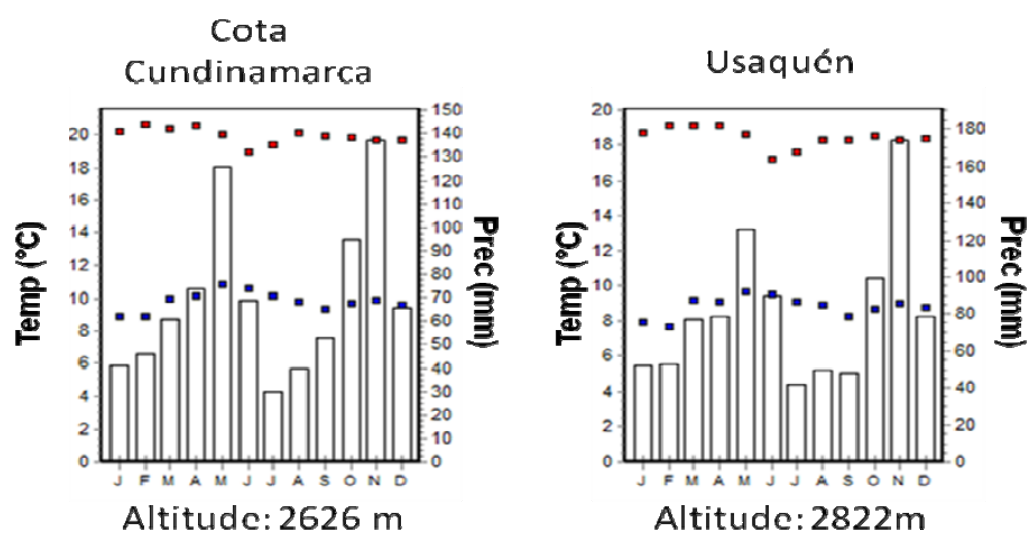


Figure III.42 : Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte de *Physalis* : (A) d'Ouganda, (B) d'Égypte et (C) de Colombie

Tableau III.7 : Températures moyennes, pluviométries annuelles et altitude des sites de récolte de *Physalis* d'Ouganda, d'Égypte et de Colombie*

	Ouganda		Égypte		Colombie	
	Mukono	Kawempe	Qalyoubia	Minufiya	Cota Cundinamarca	Usaquén
Température moyenne annuelle (°C)	22,7	22,9	23,3	23,3	14,9	13,6
Pluviométrie annuelle (mm)	1952	1652	27	43	2626	2822
Altitude (m)	1144	1192	13	40	838	969

* En utilisant la base de données WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005).

III.2.4.2. Analyse du Karité du Cameroun, du Sénégal et du Mali

L'échantillonnage des fruits de karités a été réalisé au mois de juillet 2008.

Les échantillons analysés sont des fruits de Karité prélevés dans différents pays :

Cameroun

- Région Adamaoua : Mbe district.

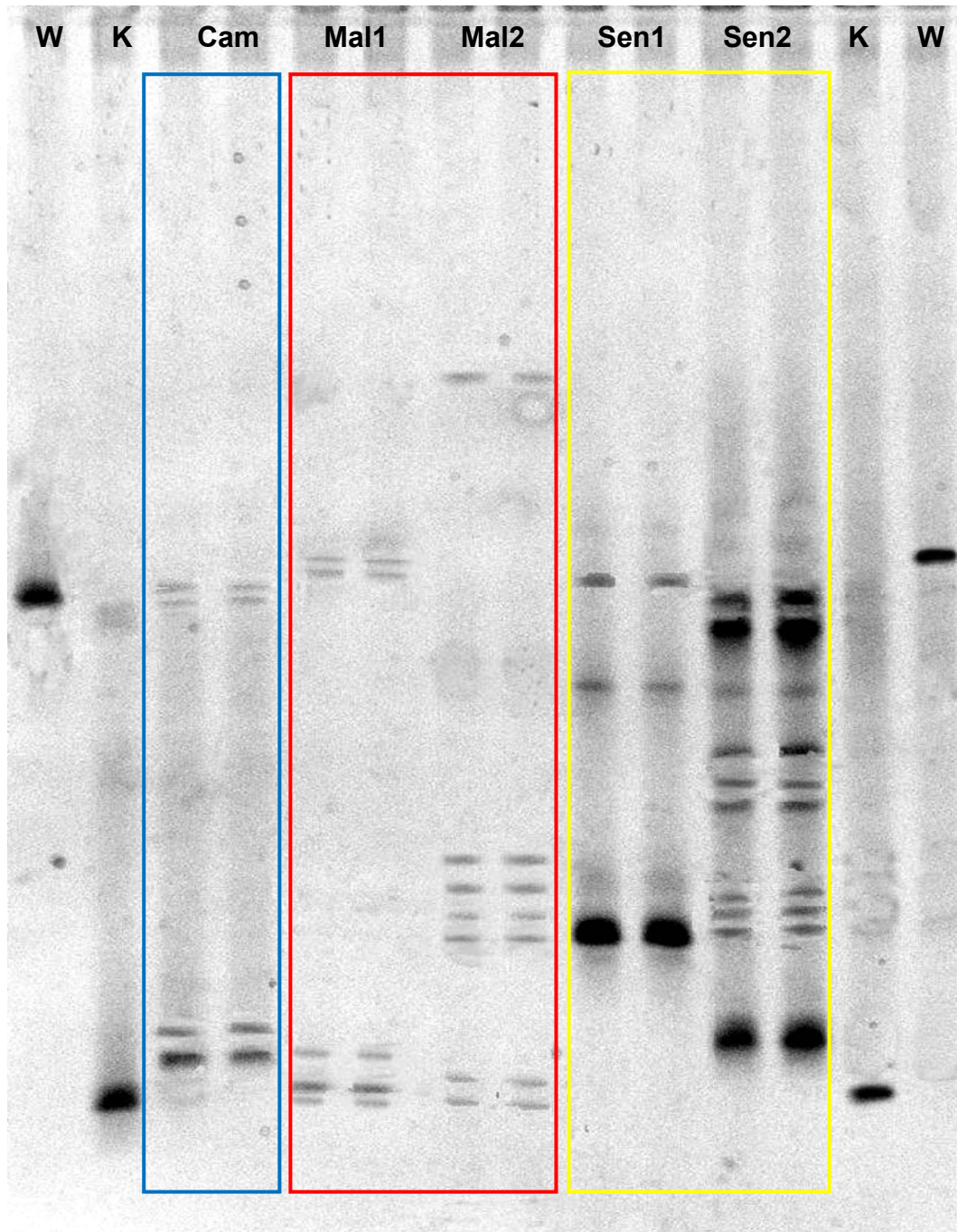
Sénégal

- Région Tambacounda : Saraya district.
Kenioto district.

Mali

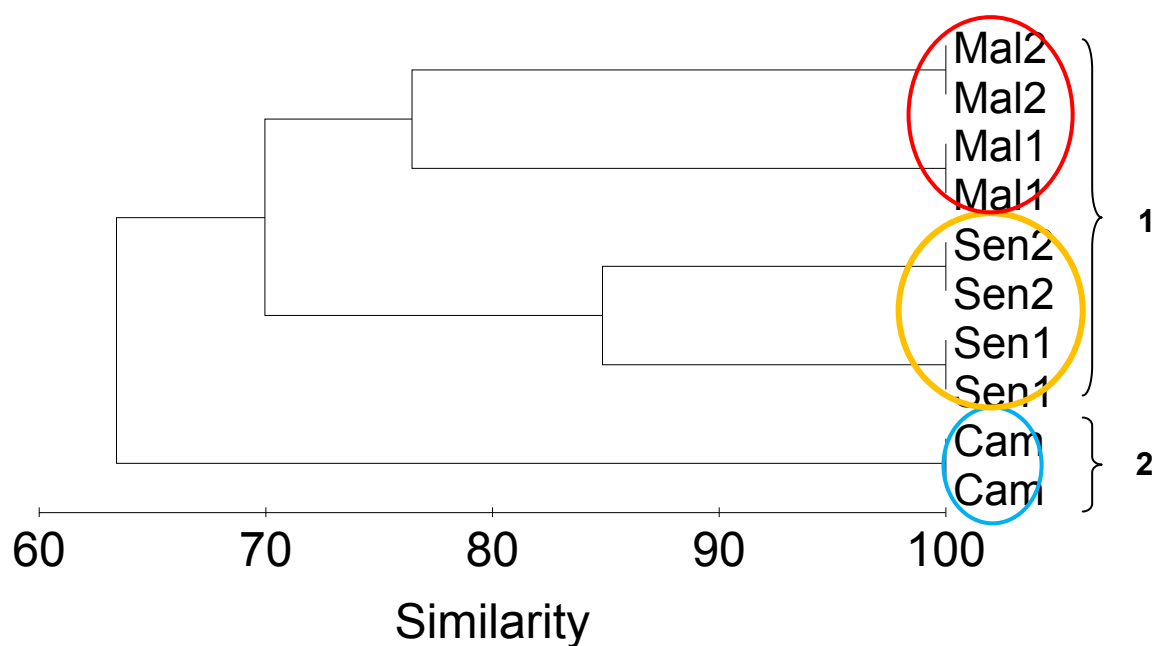
- Mopti : Tori district.
Sassambourou district.

DGGE d'ADN des levures : Le nombre de bandes des profils de DGGE pour chaque piste varie de 4 à 9 bandes pour les Karités du Sénégal, de 6 à 7 bandes pour ceux de Mali et est de 4 bandes pour les Karités du Cameroun. L'observation du gel de DGGE permet de dire que les duplicatas des profils de DGGE d'ADN levurien extrait des fruits de Karité pour chaque district sont similaires pour chacun des pays (Figure III.43). À 63% de similarité (Figure III.44), deux groupes principaux ont été observés : le premier groupe comprend les échantillons provenant de Mali et du Sénégal, le deuxième groupe comprend les échantillons provenant du Cameroun (El Sheikh *et al.*, 2010).



W: *Wickerhamomyces anomalus*; K: *Komagataella pastoris*; Cam: Cameroun; Mal: Mali; Sen: Sénégal.
(1, 2) Régions différentes

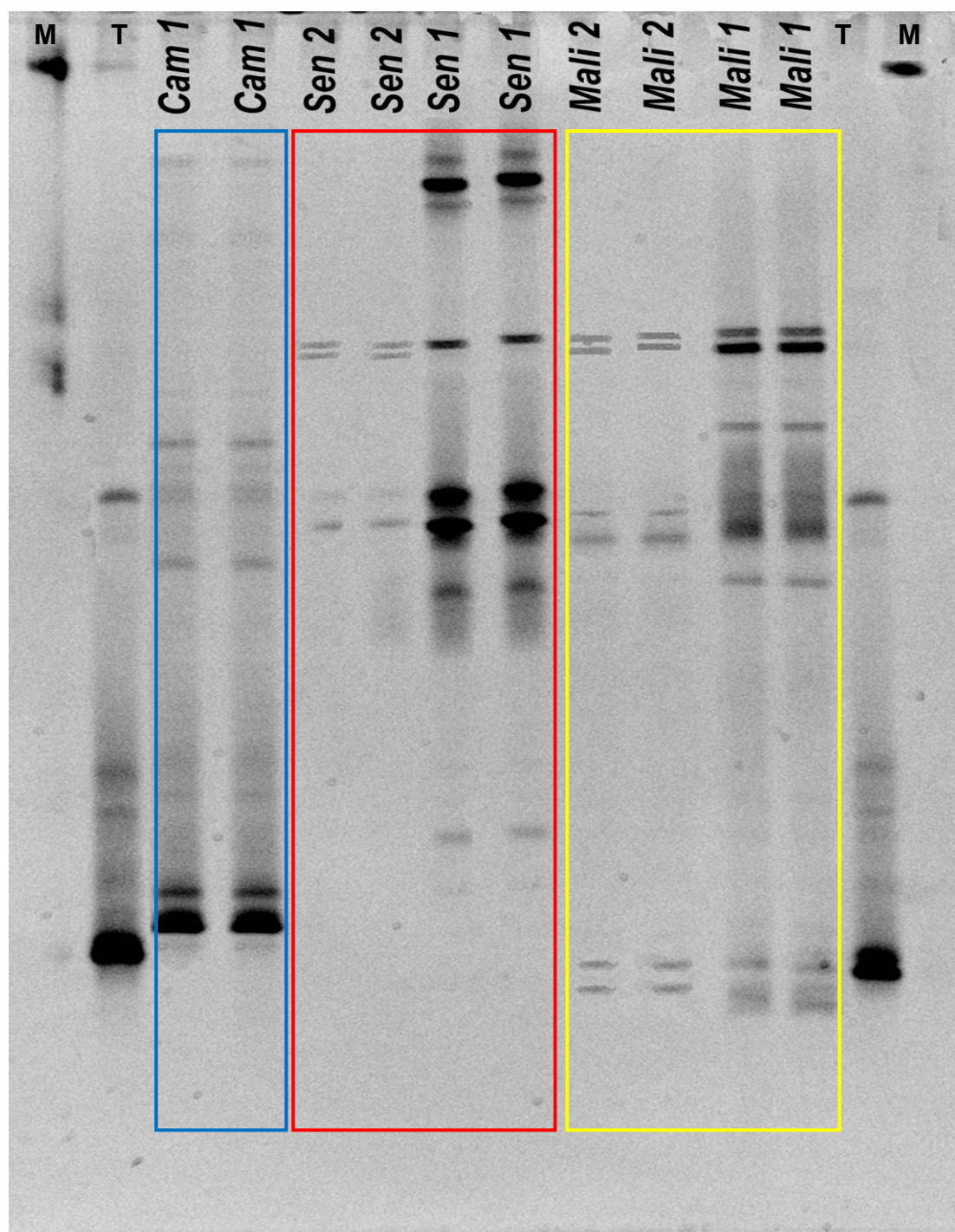
Figure III.43 : Photo du gel de DGGE d'ADN des levures extraites de Karité du Cameroun, du Mali et du Sénégal



Cam: Cameroun; Mal: Mali; Sen: Sénégal. (1, 2) Régions différentes

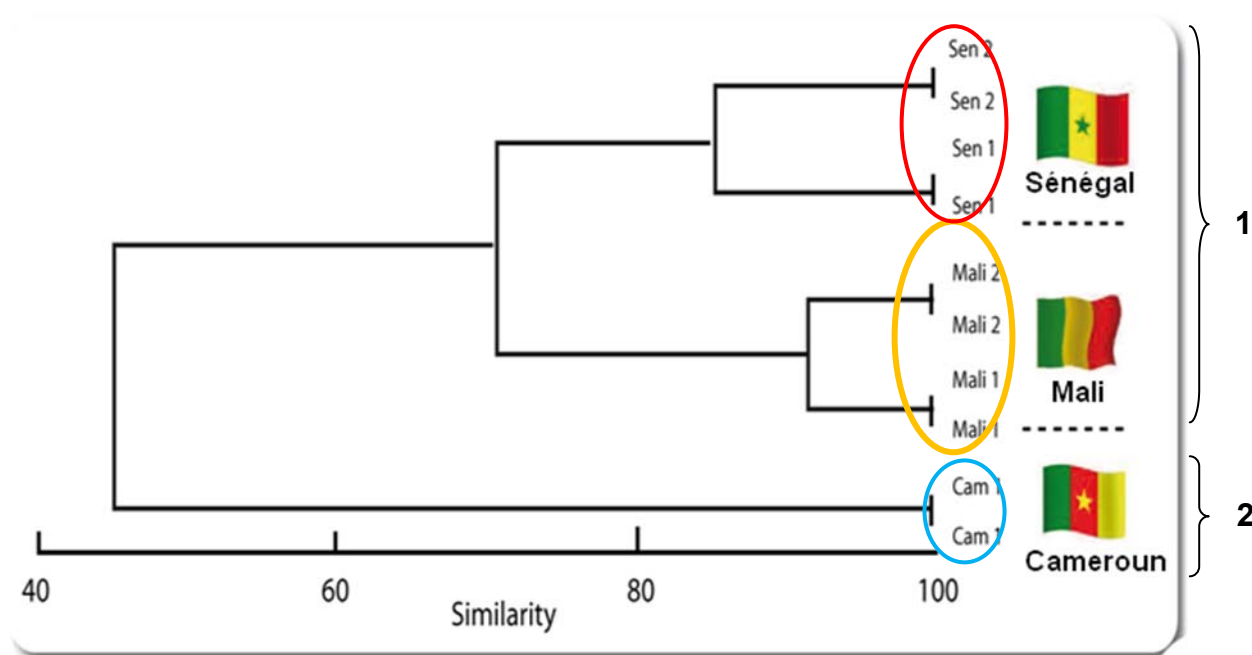
Figure III.44 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des levures extraites de Karités du Cameroun, du Mali et du Sénégal

DGGE d'ADN des moisissures : Le nombre des bandes des profils de DGGE pour chaque piste varie de 4 à 8 bandes pour les Karités du Sénégal, de 6 à 9 bandes pour ceux de Mali et est de 10 bandes pour les Karités du Cameroun. Ici aussi, les duplicatas des profils de DGGE d'ADN de moisissures extraites des fruits de Karité pour chaque district sont similaires pour chacun des pays (Figure III.45). À 45% de similarité (Figure III.46), deux groupes principaux ont été observés : le premier groupe comprenait les échantillons provenant du Mali et du Sénégal, le deuxième groupe les échantillons provenant du Cameroun (El Sheikha *et al.*, 2010c).



M: *Mucor racemosus*; T: *Trichoderma harzianum*; Cam: Cameroun; Mali: Mali; Sen: Sénégal. (1, 2)
Régions différentes

Figure III.45 : Photo du gel de DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karité du Cameroun, du Mali et du Sénégal



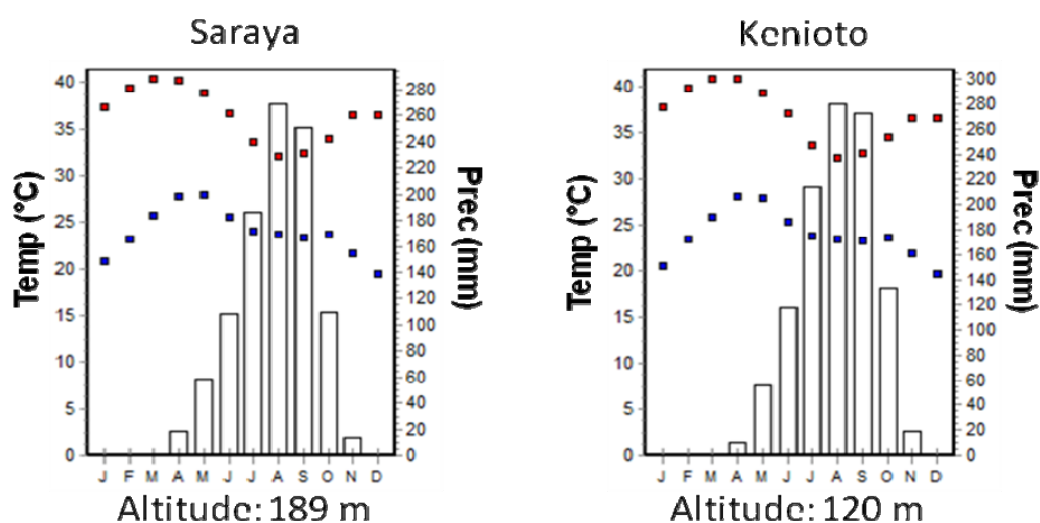
Cam: Cameroun; Mali: Mali; Sen: Sénégal. (1, 2) Régions différentes

Figure III.46 : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites de Karités du Cameroun, du Mali et du Sénégal

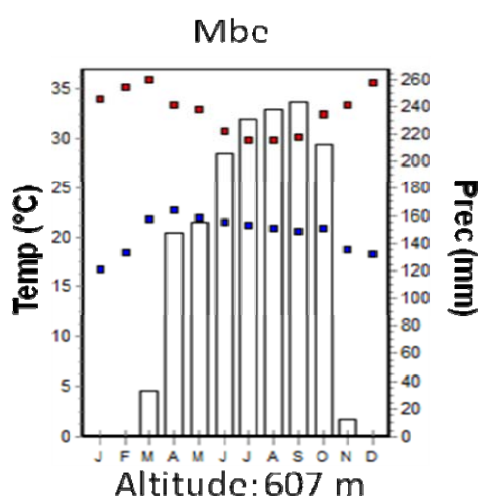
Nous sommes amenés à émettre les mêmes conclusions que pour le *Physalis*. Les profils de DGGE d'ADN de levures et de moisissures du Cameroun sont en effet très différents de ceux du Mali et du Sénégal. Les analyses statistiques (Figures III.44 et III.46) confirment ces observations, à savoir que les Karités d'un même pays se regroupent dans un même cluster avec 85% pour la DGGE de levures de Karité du Sénégal et 76% pour ceux du Mali. Les profils DGGE des moisissures des fruits de Karité d'un même pays se regroupent aussi dans un même cluster avec 91% pour le Karité du Mali et 86% pour ceux du Sénégal.

Ici aussi, on peut conclure que les différences environnementales très nettes entre les pays que ce soit les différences d'altitude ou de pluviométrie (Tableau III.8) où les fruits de Karité ont été récoltés ont un effet majeur sur la communauté des levures et des moisissures (Figure III.47).

(A) Sénégal



(B) Cameroun



(C) Mali

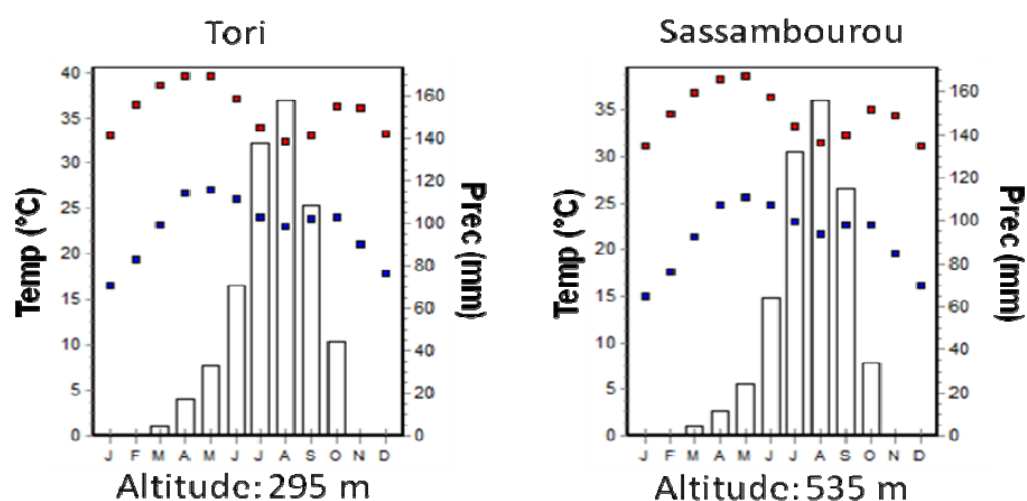


Figure III.47 : Caractéristiques environnementales (températures moyennes « maximale et minimale », pluviométrie mensuelle des sites de récolte du Karité : (A) du Sénégal, (B) du Cameroun et (C) du Mali

Tableau III.8 : Températures moyennes, pluviométries annuelles et l'altitude des sites de récolte de Karité du Sénégal, du Cameroun et du Mali *

	Sénégal		Cameroun	Mali	
	Saraya	Kenioto	Mbe	Tori	Sassambourou
Température moyenne annuelle (°C)	30,2	30,4	26,5	29,3	27,8
Pluviométrie annuelle (mm)	1015	1102	1477	575	541
Altitude (m)	189	120	607	295	535

* En utilisant la base de données WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005).

Mais il reste encore des questions qui peuvent se poser comme quel est le facteur de l'environnement entre la température, les précipitations ou bien l'altitude qui a le plus d'influence sur le contenu microbien de la zone géographique ?

A notre connaissance, il n'existe aucune information qui permette de répondre à cette question. Nos résultats permettent cependant de penser que le facteur qui a eu le plus d'influence sur le contenu microbien dans une zone géographique donnée est la pluviométrie.

III.2.5. Identification par séquençage des levures et des moisissures dominantes sur les fruits de Karité de la région de Tambacounda au Sénégal

A notre connaissance, il n'existe pas d'informations relatives aux populations des levures et des moisissures de la région de Tambacounda au Sénégal par des méthodes de culture dépendante.

Les bandes extraites du gel sur les profils DGGE d'ADN de levures et de moisissures extraites des fruits de Karité de la région de Tambacounda au Sénégal (Figure III.33 et Figure III.34) ont été séquencées afin de connaître l'identité des souches des levures et des moisissures présentes dans les échantillons de Karité.

Toutes les bandes bien distinctes sont séquencées après réamplification avec les mêmes couples d'amorces, sans le GC clamp, pour donner des amplicons d'environ 250 paires de bases pour les levures et 260 paires de bases pour les moisissures. Pour les bandes de même position dans le gel DGGE, seule une bande représentative a été séquencée, et les résultats montrent que ce sont des souches identiques.

Tableau III.9 : Noms des souches des levures obtenues par PCR-DGGE de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

Bandes n°	Identité des souches de levure selon GenBank	Similarité*	N° d'accession
1	<i>Glactomyces</i> sp	85%	AB563187
2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	90%	EU441908
3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	93%	HM461723
4	<i>Candida</i> sp	97%	AY242304
5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	98%	FR717639
6	<i>Candida tropicalis</i>	94%	HM589856
7	<i>Rhodotorula graminis</i>	99%	FR717634
8	<i>Pichia</i> sp	95%	AB598080
9	<i>Pichia kluyveri</i>	96%	FN667994
10	<i>Pichia membranifaciens</i>	87%	FR691649

* : % de similarité avec la souche de référence (N° d'accession cité)

Tableau III.10 : Noms des souches de moisissures obtenues par PCR-DGGE de Karité prélevés dans 3 districts différents de la région de Tambacounda au Sénégal

Bandes n°	Identité des souches de moisissure selon GenBank	Similarité*	N° d'accession
1	<i>Penicillium griseofulvum</i>	90%	GU566224
2	<i>Aspergillus versicolor</i>	98%	HQ316565
3	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	96%	HQ248205
4	<i>Paecilomyces variotii</i>	91%	GU966517
5	<i>Penicillium</i> sp	87%	GQ418173
6	<i>Fusarium oxysporum</i>	95%	GU566301
7	<i>Aspergillus aculeatus</i>	93%	HQ166575
8	<i>Penicillium chrysogenum</i>	92%	HQ026731
9	<i>Aspergillus</i> sp	89%	HQ166611
10	<i>Trichoderma rossicum</i>	85%	HQ342420
11	<i>Cladosporium</i> sp	97%	HQ316573

* : % de similarité avec la souche de référence (N° d'accession cité)

Chaque bande séquencée correspond à une séquence unique suffisamment longue pour permettre une identification par comparaison des séquences avec celles répertoriées dans Genbank (Tableaux III.9 et III.10).

Les souches identifiées sont bien issues de l'environnement, comme *Aureobasidium pullulans* qui est un champignon de type levure que l'on retrouve dans différents milieux (sol, eau, et air) (Chi *et al.*, 2009). La moisissure *Fusarium oxysporum* est retrouvée sur de nombreuses plantes et il en existe de très nombreuses espèces spécialisées (Anaissie *et al.*, 2001). Leur présence sur le fruit est bien le reflet de l'environnement des zones de prélèvement donc elles pourraient servir de marqueurs de l'origine géographique des fruits. Ces résultats peuvent donner une idée de la biodiversité des levures et des moisissures en fonction de l'origine géographique.

III.3. Étude de la pérennité du marquage microbien

Nous avons montré qu'il était possible de caractériser des fruits de *Physalis* et de *Karité* par leurs profils des levures et des moisissures mis en évidence par la PCR-DGGE et que ces profils pouvaient être reliés assez finement à une origine géographique. Ainsi ces profils des levures et des moisissures constituent un marquage de l'origine. Ce marquage repose sur la présence de telle ou telle souche de levure et de moisissure particulière des fruits et sa combinaison avec d'autres souches. Pour valider la méthode proposée, il nous a semblé nécessaire de savoir si le marquage ainsi défini était pérenne tout au long de la saison de récolte par exemple pour le *Physalis*.

III.3.1. Influence de la saison sur les marqueurs «levure et moisissure»

L'échantillonnage a été réalisé tout au long de la saison de récolte du *Physalis* de mars à juin 2008 en Égypte dans la même région « Qalyoubia », et dans le même district « Arabe El-Rawshda ».

Les résultats d'électrophorèse obtenus par DGGE d'ADN de levures et de moisissures extraites de *Physalis* sont présentés dans les figures III.48 et III.50. Les bandes de profils DGGE de chaque piste sont intenses et distinctes. Le nombre des bandes des profils DGGE est de 7 bandes pour les levures et de 6 à 7 bandes pour les moisissures pendant la saison de récolte. On remarque que les profils de DGGE pour les levures et pour les moisissures dans le même district restent relativement

identiques au cours la saison de récolte. L'analyse de similarité des profils DGGE (Figures III.49 et III.51) confirme les observations précédentes avec une similarité de 96% pour levures et de 98% pour les moisissures.

Nous pensons que la forte similarité entre les profils DGGE pour les levures ou pour les moisissures des fruits issus du même district est due à la stabilité des facteurs environnementaux au cours de la saison de récolte.

Enfin, avec ces résultats permettent d'expliquer et confirmer que les différences environnementales ont des effets majeurs sur la communauté des levures et des moisissures.

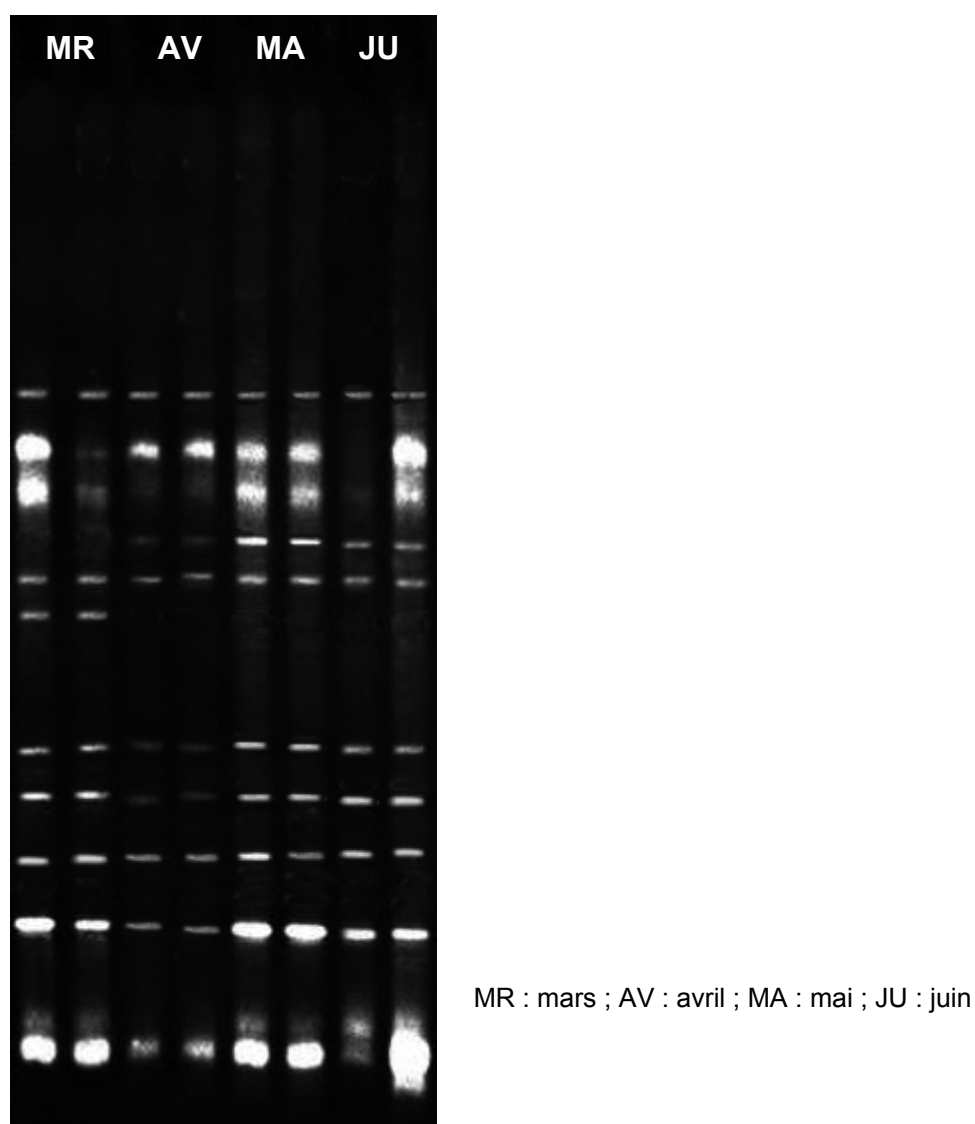


Figure III.48 : Photo de gel de DGGE d'ADN de levures extraites de *Physalis* dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte

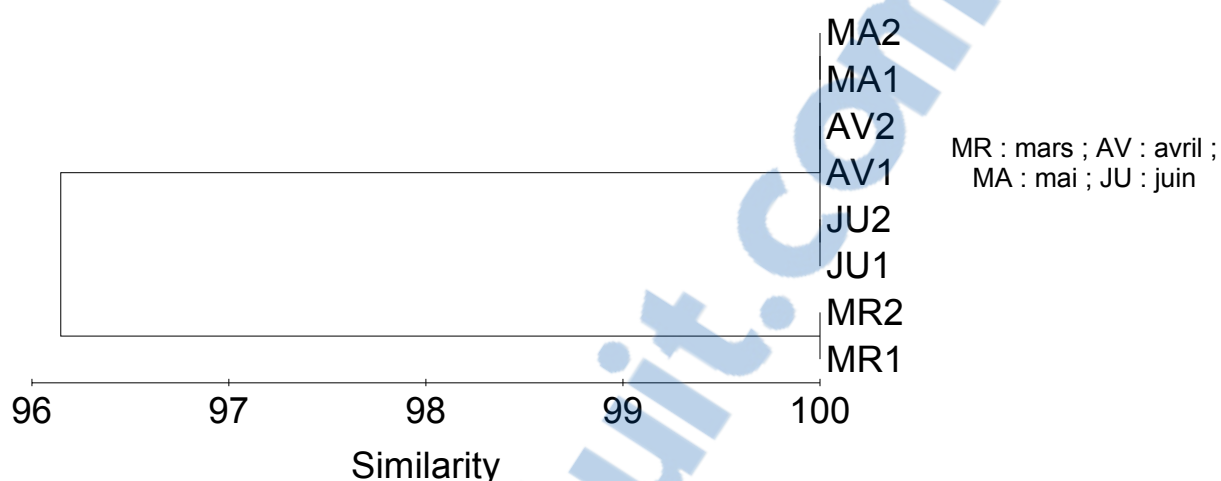


Figure III.49 : Dendrogramme de profil DGGE d'ADN de levures extraites de *Physalis* dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte

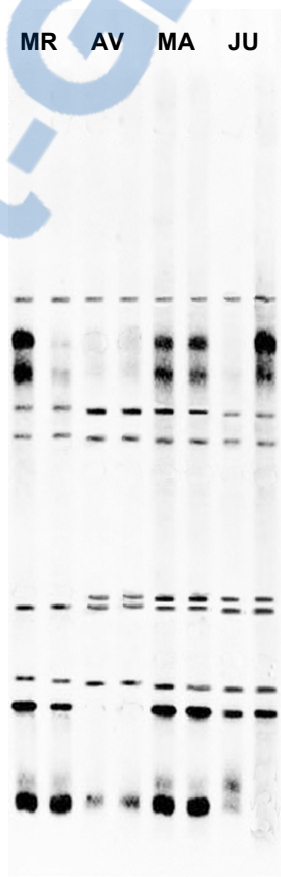


Figure III.50 : Photo de gel de DGGE d'ADN de moisissures extraites de *Physalis* dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte

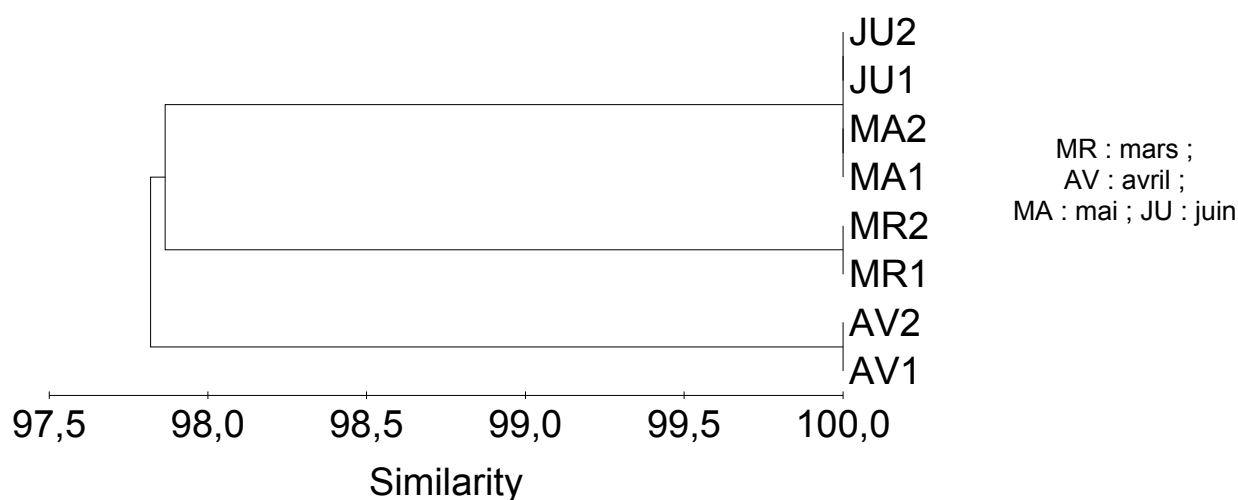


Figure III.51 : Dendrogramme de profil DGGE d'ADN de moisissures extraites de *Physalis* dans le même district d'Arabe El-Rawshda de la région de Qalyoubia pendant la saison de récolte

III.4. Étude de la composition principale du jus de *Physalis* (*Physalis pubescens* L.)

III.4.1. Teneur en matière sèche et degré Brix du jus de *Physalis*

Le jus brut de *Physalis* avait $10,66 \pm 0,14\%$ de matière sèche, ce qui est plus élevé que celui du jus de cantaloupe (8,5%) (Moustufa, 2002) et du jus de citron (9,3%) (USDA, 2006), mais cette matière sèche est plus faible que celle des jus d'orange fraîche (11,7 %) et du jus de mangue (19,1%) (Zeid, 1996). Le °Brix du jus de *Physalis* était de $10,7 \pm 0,10$, ce qui est plus élevé que celui du jus de cantaloupe frais (8,4 °Brix) (Moustufa, 2002), alors qu'il est inférieur à celui du jus de mangue fraîche (18,2 °Brix) rapporté par Zeid (1996).

III.4.2. Propriétés physico-chimiques et composition chimique du jus de *Physalis*

Les couleurs dominantes du jus de fruits de *Physalis* frais étaient jaune et rouge (Tableau III.11). Ce type de couleur a également été trouvé pour *Physalis peruviana* (Raghava et Nisha, 1990), *Physalis ixocarpa* (Cantwell et al., 1992) et pour *Physalis pruinosa* (Abou-Gharbia et Abou-Tour, 2001). Le pH de 3,54 (Tableau III.11) du jus frais est plus élevé que les jus d'agrumes (pH 2,3 pour la lime et pH 2,4 pour le jus de citron (USDA, 2006), alors qu'il est proche de celui des jus d'orange (pH 3,6) (Carvalho et al., 2006). Son acidité titrable totale atteint 1,43% (Tableau

III.11). Ce qui est plus élevé que celui rapporté pour le jus de citron avec 1,15% (Joslyn, 1970) et le jus de cantaloupe avec 0,04% (Galeb *et al.*, 2002), mais elle est inférieure à celle de deux variétés de jus de mangue (2,29% et 4,11%) (Zeid, 1996). Son rapport sucre/acide est élevé avec 7,6/1 (Tableau III.11). Il est plus élevé que celui du jus de cantaloupe frais (2,1/1) (Moustufa, 2002), alors qu'il est inférieur à celui rapporté pour le jus de mangue fraîche (7,9/1) (Zeid, 1996).

Le jus de fruits frais a une très forte teneur en caroténoïdes ($70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur base poids humide) (Tableau III.11). A titre de comparaison, le jus de cantaloupe contient seulement $7,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Moustufa, 2002), le citron $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et l'orange $3,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (USDA, 2006).

Il contenait une quantité considérable de polyphénols ($76,6 \text{ mg.100 mL}^{-1}$ sur base poids humide) exprimé en acide tannique (Tableau III.11). Cette teneur est cependant inférieure à celle du jus d'abricot frais $150,3 \text{ mg.100 mL}^{-1}$ (El Sheikha, 2004).

L'acide ascorbique a été mesuré à $38,77 \text{ mg.100 mL}^{-1}$ (base poids humide) (Tableau III.11), ce qui équivaut à celui du jus de cantaloupe ($37 \text{ mg. 100mL}^{-1}$) et est supérieur au jus de fruits frais d'abricot $21,75 \text{ mg.100 mL}^{-1}$ (El Sheikha, 2004), mais le jus de Physalis en contient moins que le citron ($46 \text{ ml mg.100}^{-1}$) et le jus d'orange ($50 \text{ mg.100 mL}^{-1}$) (USDA, 2006).

Tableau III.11 : Caractéristiques physico-chimiques et composition chimique du jus de *Physalis pubescens* *

Caractéristiques physico-chimiques		
Rendement en jus %		$63,9 \pm 2,4$
Valeur du pH		$3,54 \pm 0,005$
Acidité totale (en acide citrique anhydre) %		$1,43 \pm 0,08$
Ratio sucre/acide		$7,59/1 \pm 0,49$
Couleur mesurée par Lovibond		
Bleu		$2,1 \pm 0,02$
Jaune		$35,0 \pm 0,04$
Rouge		$6,6 \pm 0,01$
Composition chimique		
Composants	Teneur dans le jus de Physalis (base poids humide)	Teneur dans le jus de Physalis (g.100 g ⁻¹ de matière sèche dans le jus)
H ₂ O	89,34%	0
Protéines	1,02%	$13,4 \pm 0,24$
Lipides	0,13%	$1,1 \pm 0,02$
Minérales	0,75%	$17,80 \pm 0,81$
Total sucres	6,95%	$65,2 \pm 0,21$
Caroténoïdes	$70 (\mu\text{g.mL}^{-1})$	$0,1 \pm 0,01$
Polyphénols en acide tannique"	$76,6 (\text{mg.100 mL}^{-1})$	$0,7 \pm 0,05$
Acide ascorbique	$38,77 (\text{mg.100 mL}^{-1})$	$0,4 \pm 0,07$
Pectine	0,14%	$1,2 \pm 0,01$
Total	≈ 100	≈ 100

* Les valeurs sont des moyennes de 3 déterminations \pm écart type

III.4.3. Composition minérale du jus de Physalis

Le jus brut de Physalis a une teneur élevée en potassium ($1210 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base poids humide) et en sodium (40 mg.100 g^{-1} base humide) (Tableau III.12). Ces deux éléments minéraux jouent un rôle capital dans le contrôle du bilan hydrique de l'organisme. Parmi les autres fruits, la teneur en potassium est beaucoup plus faible dans les jus de lime, de citron et d'orange (110 , 120 et $200 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base humide) respectivement (USDA, 2006). L'exigence de l'homme pour le K est de 4700 mg par jour (DRIs, 2004). La teneur en phosphore qui est de $590 \text{ mg.100 g}^{-1}$ (base humide) est plus élevée que celui des jus de lime, de citron et d'orange (14 , 6 et 17 mg.100^{-1} base humide) (USDA, 2006). Les besoins humains sont de 700 mg de phosphore par jour (DRIs, 2004). La teneur en calcium du jus de Physalis est de 70 mg.100 g^{-1} (base humide) et est donc plus élevée que celles des jus de lime, de citron et d'orange (14 , 7 et 11 mg.100 g^{-1} base humide) (USDA, 2006). La consommation d'aliments riches en calcium comme par exemple les produits laitiers, est fortement recommandée pour les personnes à risque : personnes âgées, diabétiques, etc. Les apports alimentaires recommandés en calcium sont de 1000 mg par jour (DRIs, 2004). La teneur en magnésium du jus de Physalis (20 mg.100 g^{-1} base humide) est plus élevée que celles des jus de citron vert, citron et orange (8 , 6 et 11 g mg.100^{-1} base humide) (USDA, 2006). La consommation en magnésium des hommes est souvent inférieure à celle recommandée qui est de 300 à 400 mg par jour (DRIs, 2004). La teneur en zinc du jus de physalis (2 mg.100 g^{-1} base humide) est plus élevée que celles des jus de lime, de citron et d'orange ($0,08$, $0,05$ et $0,05 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base humide) (USDA, 2006). Le zinc est présent dans une grande variété d'aliments et il est relativement élevé dans les noix, les légumineuses et les céréales à grains entiers et en plus faible quantité dans les fruits et les légumes (Cousins, 1996). Les apports recommandés en zinc pour les humains sont de 8 à 11 mg par jour (DRIs, 2004). La teneur en cuivre du jus de Physalis ($1,5 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base humide) est plus élevée que celles des jus de citron vert, citron et orange ($0,027$, $0,029$ et $0,044 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base humide) (USDA, 2006). Le cuivre est un nutriment essentiel requis par le corps humain et est nécessaire en quantités de $0,9 \text{ mg}$ par jour (DRIs, 2004). La teneur en fer du jus brut de Physalis ($1,2 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base humide) est plus élevée que celles des jus de lime, de citron et d'orange ($0,09$, $0,03$ et $0,2 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base humide) (USDA, 2006). L'apport recommandé en fer est de 8 à 18 mg par jour (DRIs, 2004). La teneur en manganèse du jus de fruits Physalis ($1,2 \text{ mg.100 g}^{-1}$ base

humide) est plus élevée que celles des jus de citron vert, citron et orange (0,018, 0,008 et 0,014 mg.100 g⁻¹ base humide) (USDA, 2006). L'apport recommandé en manganèse est de 1,8 à 2,3 mg par jour (DRIs, 2004).

En outre, le jus de *Physalis* a un bon niveau de bore (1,1 mg.100 g⁻¹ base humide) supérieur à plusieurs aliments consommés, comme les produits de boulangerie et de viande (Hunt et Herbei, 1991 ; Anderson *et al.*, 1994). Les apports recommandés en bore sont de 1 à 13 mg par jour (Wardlaw et Kessel, 2002).

Tableau III.12 : Composition minérale du jus (mg.100 g⁻¹ base humide) de *Physalis pubescens* L

Potassium	1210
Phosphore	590
Calcium	70
Sodium	40
Magnésium	20
Zinc	2
Cuivre	1,5
Fer	1,2
Manganèse	1,2
Bore	1,1

III.4.4. Composition en sucre du jus de *Physalis*

Le jus brut contient 2,28 g.L⁻¹ de glucose, 2,31 g.L⁻¹ de fructose et 2,81 g.L⁻¹ de saccharose. Ces quantités sont plus faibles que celles trouvées dans les jus de lime : 6 g.L⁻¹ de glucose, 6,1 g.L⁻¹ de fructose et de 4,8 g.L⁻¹ de saccharose (USDA, 2006). La teneur totale en sucre (glucose + fructose + saccharose) du jus de *Physalis* est de 7,4 g.L⁻¹ (base humide). Ce contenu est inférieur à celui du jus de lime (16,9 g.L⁻¹) (USDA, 2006).

III.4.5. Composition en polyphénols du jus de *Physalis*

Douze fractions phénoliques ont été identifiées dans l'extrait méthanolique du jus de *Physalis* (Tableau III.13). Les principaux composés phénoliques trouvés dans le jus de fruits frais ont été la catéchine, les acides salicylique, para-coumarique et chlorogénique. Les composés prédominants étaient les phénols suivis par l'acide férulique. D'autre part, El Sheikha *et al.* (2008) ont déclaré que les principaux composés phénoliques du jus frais d'abricot étaient les acides férulique, salicylique et chlorogénique, avec comme composé prédominant le résorcinol.

Tableau III.13 : Composés phénoliques du jus brut de *Physalis pubescens* L

Composés phénoliques	Contenu ($\mu\text{g.L}^{-1}$ jus)
Acide protocatéchique	9,32
Acide para-hydroxybenzoïque	5,61
Acide chlorogénique	20,86
Catéchine	49,68
Phénol	156,05
Acide vanillique	27,27
Acide para-coumarique	53,68
Acide férulique	100,36
Acide salicylique	73,41
Rutine	4,49
Acide coumarique	1,76
Myricétine	1,04
Pyrogallique	nd*
Hydroquinone	nd
Acide gallique	nd
Résorcinol	nd
Acide ortho-coumarique	nd
Acide cinnamique	nd
Quercétine	nd
Kaempférol	nd

* nd = non détecté.

III.4.6. Acides aminés et composition en protéines du jus de *Physalis*

L'analyse des acides aminés du jus de *Physalis* (Tableau III.14) a montré que les acides aminés essentiels tels que la leucine, lysine, isoleucine, valine, tryptophane, la sérine et thréonine étaient en quantités supérieures à celles recommandées par la FAO/WHO/UNU (1985). La proline, les acides aspartique et glutamique, l'alanine et la glycine sont les principaux acides aminés (Tableau III.15). La teneur en protéines du jus est faible (1,02% en poids frais), mais sa valeur nutritive est bonne par rapport aux protéines de l'œuf en raison de sa teneur relativement élevée en acides aminés essentiels et sa bonne digestibilité. La teneur en protéines est plus élevée que celle du jus de cantaloupe (0,69%) (Moustufa, 2002), de citron (0,38%) et de jus d'orange (0,70%) (USDA, 2006).

Tableau III.14 : Composition centésimale en acides aminés du jus de Physalis comparée à celle recommandée par la FAO/WHO/UNU

Acides aminés	Contenu (g.100 g ⁻¹ protéine)	Recommandation de la FAO *		
		(g, 100 g ⁻¹ protein)		
		Enfant 2-5 ans	Enfants 10-12 ans	Adultes
Isoleucine	4,236	2,8	2,8	1,3
Leucine	4,968	6,6	4,4	1,9
Lysine	4,762	5,8	4,4	1,6
Cystéine	1,291	—	—	—
Méthionine	1,694	—	—	—
Total des acides aminés soufrés	2,985	2,5	2,2	1,7
Tyrosine	1,066	—	—	—
Phénylalanine	2,585	—	—	—
Total des acides aminés aromatiques	3,651	6,3	2,2	1,9
Thréonine	3,377	3,4	2,8	0,9
Tryptophane	3,893	1,1	0,9	0,5
Valine	3,927	3,5	2,5	1,3
Total des acides aminés essentiels	31,799	32,0	22,2	11,1
Histidine	3,223	—	—	—
Arginine	2,787	—	—	—
Acide aspartique	14,469	—	—	—
Acide glutamique	13,185	—	—	—
Serine	3,545	—	—	—
Proline	18,296	—	—	—
Glycine	5,532	—	—	—
Alanine	7,163	—	—	—
Total non-acides aminés essentiels	68,20	—	—	—

* FAO/WHO/UNU (1985). FAO, de l'Alimentation et l'Agriculture.

Tableau III.15 : Acides aminés indispensables dans le jus brut de Physalis comparés avec les RDAs*

Acides aminés essentiels	Contenu (mg.100 mL ⁻¹ jus)	RDAs (mg/jour)*			Valeur dans 100 mL de jus consommés / RDAs × 100		
		2-5 ans	10-12 ans	Adultes	2-5 ans	10-12 ans	Adultes
Isoleucine	42,97	403	784	580-720	10,66	5,48	5,97-7,41
Leucine	50,39	949	1176	812-1008	5,31	4,28	5,0-6,21
Lysine	48,30	832	1232	696-864	5,81	3,92	5,59-6,94
Méthionine + cystéine	30,28	351	616	754-936	8,63	4,92	3,24-4,02
Phénylalanine + tyrosine	37,03	897	616	812-1008	4,13	6,01	3,67-4,56
Thréonine	34,26	481	784	406-504	7,12	4,37	6,80-8,44
Tryptophane	39,83	162,5	92,4	203-252	24,51	43,11	15,81-19,62
Valine	39,92	494	700	580-720	8,06	5,69	5,53-6,87
Total	322,56	4576	5992	4872-6048	7,05	5,38	5,33-6,62

* RDAs = apports nutritionnels conseillés (1989)

III.4.7. Teneur en huile et composition en acides gras de l'huile extraite à partir du jus de *Physalis*

La teneur en huile du jus de *Physalis* est très faible (1,1 g.100 g⁻¹ matière sèche), mais ce contenu est équivalent à celui des jus d'agrumes tel que le jus d'orange (1,7%) (USDA, 2006). Le pourcentage en acides gras insaturés et polyinsaturés de l'huile de *Physalis* égyptienne était de 65,5%. Cette teneur importante est pourtant inférieure à celle de l'huile de maïs qui est de 85,5% ou de l'huile d'olive avec 83,4%. L'étude de la composition en acides gras (Tableau III.16) montre les éléments suivants:

- L'acide oléique C18:1 n-9 est présent en quantité beaucoup plus importante (23,42%) dans l'huile de *Physalis* que dans l'huile du jus de pamplemousse (0,1%), de fruits de la passion (0,2%) et d'orange (0,3%) (USDA, 2006). La teneur en acide linoléique C18: 2 n-6 est plus faible (5,47%) que dans l'huile de maïs (53%) et l'huile d'olive (9%) mais il y a un niveau élevé d'acide linolénique C18:3 n-3 (27,0%) dans l'huile de jus de *Physalis*.

Une des caractéristiques importantes de cette huile est l'absence d'acides gras à courte chaîne, tels que l'acide hexanoïque C6:0 et caprylique C8:0 qui pourraient expliquer l'absence d'odeur désagréable dans le jus de *Physalis pubescens*.

L'indice d'iode de l'huile du jus de *Physalis* est de 112,3. Il est plutôt élevé si on le compare à celui de l'huile de palme (56,9) (Itoh *et al.*, 1972), l'huile de tournesol (90,0) (Pérez-Galvez *et al.*, 2000), l'huile d'olive (81,3) (Kamal-Eldin et Andersson, 1997) et l'huile d'amande (100,3) (Itoh *et al.*, 1972). Il est cependant inférieur à celui des huiles insaturées comme l'huile de maïs (120,5) (Gordon et Miller, 1997). Cela est dû à la forte proportion d'acides gras insaturés dans le jus de *Physalis* comme l'acide oléique (23,42%) et l'acide linolénique (27,0%).

Tableau III.16 : Composition centésimale en acide gras de l'huile de jus de *Physalis pubescens* comparée à celles de l'huile d'olive et de maïs

	huile de jus de Physalis	huile d'olive	huile de maïs
C10:0	1,95	nd*	nd
C12:0	1,91	nd	nd
C14:0	1,27	nd	0,0
C15:0	0,41	—	—
C15:1	0,46	—	—
C16:0	23,27	13,8	11,7
C16:1	1,53	1,4	0,1
C17:0	0,37	—	—
C18:0	4,81	2,8	2,2
C18:1 (n-9)	23,42	72	31,6
C18:1 (n-7)	6,85	—	—
C18:2 (n-6)	5,47	9,0	53,0
C18:3 (n-3)	26,98	1,0	0,8
C20:0	0,54	nd	0,4
C20:1	0,77	—	—
Total	100	100	100
Non saturés	65,5	83,4	85,5

* nd = non détecté

III.5. Évaluation sensorielle du jus de Physalis

Un panel de consommateurs de 20 membres ont évalué le jus de Physalis (Tableau III.17). L'évaluation sensorielle réalisée par El Sheikha *et al.* (2010d) a montré que les panélistes ont évalué le produit avec une haute valeur d'acceptabilité (très bon 8/10) en considérant les attributs tels que la couleur (8.5/10), le goût (9.1/10), la texture (8.6/10), l'odeur (8,3/10), l'homogénéité (8.4/10) et l'apparence générale (7.9/10).

Tableau III.17 : Evaluation sensorielle du jus de Physalis

Attributs *	Jus de Physalis (×/10)
Couleur	8.5
Goût	9.1
Texture	8.6
Odeur	8.3
Homogénéité	8.4
Apparence générale	7.9
Acceptabilité globale	8.0

* Les valeurs sont des moyennes des scores de l'expert (n = 20). 9-10 = excellent; 7-8 = très bonne; 5-6 bonne, 4 = faible; 2-3 = inacceptable

III.6. Étude des activités biologiques d'extraits de *Physalis*

III.6.1. Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques du jus de *Physalis*

Les souches de *Bacillus subtilis*, *Fusarium solani*, *Escherichia coli* O157: H7 et *Candida albicans* sont les microorganismes qui causent le plus d'altération dans les jus qui pourraient affecter la santé humaine (Hilborn *et al.*, 2000 ; Health Notes, 2002). *Bacillus subtilis* n'est pas considéré comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire (Ryan et Ray, 2004). *Fusarium solani* est un agent de mycotoxicoses du bétail. C'est une espèce pathogène pour l'homme. Elle produit la toxine T2. La toxine T2 est une mycotoxine de la famille des trichothécènes toxique pour l'homme et les animaux. Elle est responsable de fusarioses cutanées et de mycétomes à grains blancs (Laydon *et al.*, 1977). *Escherichia coli* O157:H7 est une souche entérohémorragique responsable de maladies graves d'origine alimentaire (Karch *et al.*, 2005). *Candida albicans* est une levure qui se trouve généralement dans la flore régulière de la peau, du tractus intestinal et de la bouche, du rectum et du vagin. Bien que *Candida albicans* soit présent naturellement dans le corps, elle peut causer des problèmes si elle prolifère pour donner une candidose. La candidose est une infection fongique de surface, comme le muguet buccal ou la vaginite qui peuvent être potentiellement mortelle (Walsh et Dixon, 1996). Les deux concentrations de l'extrait méthanolique (15 et 30%) obtenu à partir de jus brut de *Physalis*, ont montré une activité antimicrobienne significative contre *E. coli* O157:H7 et une activité antifongique totale contre *Fusarium solani* (Tableau III.18). *Bacillus subtilis* a montré une résistance à la concentration la plus faible (15%). Au contraire, l'extrait méthanolique du jus de *Physalis* aux deux concentrations n'a eu aucun effet antimicrobien contre *Candida albicans* (El Sheikha, 2004 ; El Sheikha *et al.*, 2008).

Tableau III.18 : Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques obtenus à partir de jus frais de *Physalis*

Microorganismes	Test de diffusion du disque (Zones d'inhibition, en mm) *	
	Concentration des composés phénoliques (%)	
	15	30
<i>E. coli</i>	10	10
<i>B. subtilis</i>	NI**	8
<i>C. albicans</i>	NI	NI
<i>F. solani</i>	67.0	90

* Zones d'inhibition = mesures par diamètre du disque (6 mm)

** NI = Non inhibition observée à tout moment

Rapport gratuit.com

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Afin de satisfaire à nos objectifs, nous nous étions posé quelques questions de recherche auxquelles nous avons répondu lors de ces travaux de thèse.

A propos du choix de la PCR-DGGE pour déterminer l'origine géographique des fruits

La première étape de ce travail a été d'explorer la variabilité, la fiabilité et la robustesse de la PCR-DGGE et nous avons montré que 2 fruits étaient le nombre minimal d'échantillons suffisamment représentatifs de l'origine géographique. Nous avons montré que la distance relative de chacune des bandes ne diffère pas d'un gel à l'autre ($p < 0,05$).

Le principal résultat de cette thèse est que l'analyse des ADN des flores des levures et des moisissures des fruits de Karité et de Physalis, obtenus par PCR-DGGE, a montré que les profils électrophorétiques obtenus permettaient de différencier des fruits d'origines géographiques différentes (El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c).

Nous avons prouvé que les différences environnementales des lieux où les fruits de karité et de Physalis ont été récoltés ont un effet majeur sur la communauté des levures et des moisissures. Nous pensons à ce stade que le facteur qui a eu le plus d'influence sur le contenu microbien pour une zone géographique donnée est la pluviométrie.

Le séquençage des bandes extraites des gels de DGGE nous a permis d'identifier les souches des levures et des moisissures des fruits et donc de fournir des informations sur la biodiversité des levures et des moisissures qui est fonction de l'origine géographique.

La sensibilité est une caractéristique de la fidélité d'une méthode d'analyse. Plus problématique, le seuil de détection par PCR-DGGE des espèces est l'objet de

controverses. Certains auteurs estiment qu'il dépend du niveau des populations. Nous avons ainsi montré pour les levures, qu'après une étape d'incubation de 48 h à 30°C, la limite de détection est de 2.1×10^2 UFC/mL. Cette limite est plus faible que celles trouvées par d'autres auteurs comme par exemple, Cocolin *et al.* (2000) qui annoncent une population minimum de 10^4 CFU/mL. Pour les moisissures, la limite de détection trouvée est de 10^3 spores/mL. Cette limite est plus faible que celle trouvée par Durand *et al.* (2009) qui annoncent que la concentration minimum est de 10^4 spores/mL. Cette limite est en accord avec d'autres études comme celles de Van Elsas *et al.* (2000) qui donnent un seuil de détection d'environ 10^3 spores/mL pour *Trichoderma harzianum*. Saad *et al.* (2004) sont eux incapables de détecter moins de 10^5 spores/mL de *Aureobasidium pullulans* et *Epicoccum nigrum*.

Nous nous étions également posé la question de la pérennité de ce nouveau code-barre au cours du temps pour un environnement donné.

La pérennité des marqueurs des levures et des moisissures au cours de la saison de récolte a été confirmée puisque nous trouvons une forte similarité entre les profils DGGE.

En conclusion, la technique de PCR-DGGE que nous proposons est une technique globale et rapide (moins de 24 h) qui évite l'analyse précise des champignons en biochimie ou en biologie moléculaire (séquençage) (El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c). Elle a été appliquée par notre équipe à l'analyse des flores bactériennes et nous avons développé dans ce travail deux techniques innovantes qui permettent d'analyser les flores de levures et de moisissures.

Cette méthode peut ainsi être proposée comme un nouvel outil d'analyse rapide de l'origine géographique des fruits et peut être considérée comme un fournisseur d'un code-barre biologique unique des fruits pour chaque origine de récolte (El Sheikha *et al.*, 2009a ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010a,b,c).

Cette technique a en outre été validée sur d'autres matières premières (bois, noix du Brésil, café) ou d'autres contaminations (bactéries présentes sur des insectes ravageurs).

Concernant le Physalis, nous avons confirmé par nos analyses son appellation de « Fruit d'Or » que lui donnent certains pays.

Ce fruit a un remarquable potentiel agronomique qui n'a pas été pleinement apprécié. Le développement de pratiques adéquates en matière agro-techniques et de stockage pourrait faire de ce fruit une culture prometteuse et rentable pour les régions arides (El Sheikha *et al.*, 2009b).

Son jus est une source de micronutriments physiologiquement utiles. Il est riche en polyphénols et caroténoïdes. Il contient des quantités modérées de vitamine C, de lipides et de protéines. Le jus a une teneur élevée en potassium, phosphore, calcium, sodium, magnésium, zinc, cuivre, fer, manganèse et bore. Ces minéraux jouent un rôle majeur en tant que constituants des os et des dents, et participent au métabolisme.

De plus, le jus présente des activités antimicrobiennes contre certains pathogènes comme *E. coli* O157: H7, *Bacillus subtilis* et *Fusarium solani*.

Perspectives

A l'issu d'un tel travail de thèse, il reste toujours des insatisfactions et plusieurs points auraient mérité d'être soumis à l'investigation, ce qui nous permet de présenter quelques perspectives pour la suite des études à mener :

- ✓ Une observation de l'effet environnemental sur la pérennité des marqueurs sur au moins 3 années consécutives serait utile,
- ✓ la création d'une base de données contenant les profils DGGE de fruits prélevés dans des régions différentes. Cette banque serait associée à un logiciel de traitement d'image et d'analyses statistiques pour la comparaison des profils,
- ✓ la confirmation que les levures et moisissures sont de bons marqueurs d'origine puis leur caractérisation fine par des techniques moléculaires,
- ✓ Des études complémentaires à propos de la mise au point d'une nouvelle technique d'extraction des physalines à partir des graines des Physalis seraient nécessaire pour en étudier les propriétés antimicrobiennes.

Nous venons également de mettre au point l'analyse de la communauté fongique qui ouvre de nouvelles voies comme la compréhension de la communauté des champignons filamenteux producteurs de mycotoxines ou encore la compréhension de la dynamique des populations microbiennes sur les aliments au cours de procédés artisanaux ou industriels.

Grâce aux techniques développées, notre équipe a pu lancer trois nouvelles thèses, celle de Lamyia El Ayoubi sur la communauté des moisissures productrices d'aflatoxine sur les noix du Brésil, celle de Noël Durand sur les moisissures productrices d'ochratoxine sur le café et enfin celle de Clémentine Kouakou sur le suivi de procédés fermentaires traditionnels du poisson ivoiriens.

Ces trois années passées au Cirad m'ont en plus apporté le plaisir de coordonner avec Didier Montet un Work Package du projet européen Innovkar sur la traçabilité du karité et nous espérons que les techniques développées serviront un jour cette filière et bien d'autres.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abou-Gharbia, H. A., & Abou-Tour, E. M. (2001).** Properties and processing of husk tomato. *Minufiya Journal Agriculture Research*, 26, 761-781.
- Adams, S. M. (2002).** *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*, p 252.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Gómez, F., & Amils, R. (2006).** Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment. Rio Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecology*, 53, 294-305.
- Ahmed, S., Yasmin, R., & Malik, A. (1999).** New withanolide glucosides from *Physalis peruviana* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47, 477-480.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002).** *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, Garland Science, New York, 342 p.
- Alcoba-Flórez, J., Arévalo-Morales, M. P., Pérez-Roth, E., Laich, F., Rivero-Pérez, B., & Méndez-Álvarez, S. (2007).** Yeast molecular identification and typing. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez-Vilas (Ed). 535-546.
- Alexander, M. (1997).** Microbial communities and interactions: a prelude. In: *Manual of Environmental Microbiology* (J. Ch. Hurst, Ed.). ASM Press, Washington D.C., pp. 5-13.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. F. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- Amaral Zettler, L. A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B. G., Amils, R., & Sogin, M. L. (2002).** Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature*, 417, 137.
- Anaissie, E. J., Kuchar, R. T., Rex, J. H., Francesconi, A., Kasai, M., Muller, F. M. C., Lozano-Chiu, M., Summerbell, R. C., Dignani, M. C., Chanock, S. J., & Walsh, T. J. (2001).** Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 1871-1878.
- Anderson D., Cunningham W., & Lindstrom T. (1994).** Concentrations and intakes of H, B, S, K, Na, Cl, and NaCl in foods, *Journal of Food Composition Analysis*, 7, 59-82.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., & Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 25, 849-856.

Anon (1985). Energy and protein requirement, Rep. Joint FAO/WHO/UNU (Food Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations Union) Meet. Ser. No. 724, WHO, Geneva, Switz.

Anon (1995). Official methods of analysis, *Association of Official Analytical Chemists* "AOAC", 16th ed., Arlington V.A., USA.

Anon (2000). Procédure opérationnelle. Extraction des sucres au reflux d'éthanol à 80 %, Code: PC 0901A, Cirad Amis / Paa, Doc. Int., Montpellier, France, 6 p.

Anon (2001). Procédure opérationnelle. Dosage des mono et disaccharides par chromatographie ionique DX600, Code: PC 08A, Cirad Amis / Paa, Doc. Int., Montpellier, France, 7 p.

Anon (2005). Procédure opérationnelle. Préparation des esters méthyliques, Code: PC 019A, Cirad Amis / Paa, Doc. Int., Montpellier, France, 9 p.

Anon (2006). Plant production statistics bulletin, Central Agency for Public Mobilization and Statistics "CAPMAS", Statistics Sector, Cairo, Egypt.

Arrêté (2009). Arrêté du 7 janvier 2009 portant création d'un traitement de données à caractère personnel dénommé « Alertes et signalements » [archive], *Journal officiel*, 22 janvier 2009, page texte n° 43.

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020133021&dateTexte=&categorieLien=id> (Accédé Janvier 2009)

Association RECORD (2002). Aide à la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables, compostables. Rapport final du contrat N° 00-0118/1A, 153 p.

Atlas, R. M. (1988). Principles of Microbiology, Ed. Mosby, 163 p.

B

Bajaj, K. L., & Kaur, G. (1981). Spectrophotometric determination of total ascorbic acid in vegetables and fruits, *Analyst*, 106, 117-120.

Ball, L. M., Bes, M. A., Theelen, B., Boekhout, T., Egeler, R. M., & Kuijper, E. J. (2004). Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and

epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1673-1679.

Barszczewski, W., & Robak, M. (2004). Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiology*, 21, 227-231.

Bayer Crop Science (2006). The Bayer CropScience Magazine for Modern Agriculture.

<http://www.bayercropscience.com> (Accédé Mars 2006)

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.

Bex, V., & Squinazi, F. (2006). Mise en évidence de moisissures des ambiances intérieures par la mesure des (1→3)-β-D-glucanes. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46, 184-187.

Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Bowen, M. D., Meyer, R. F., & DePaola, A. (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of microbiological methods*, 53, 149-155.

Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F. & Torriani, S. (2003). Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and environmental microbiology*, 69, 4116-4122.

Bonetta, S., Bonetta, S., Carraio, E., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2008). Microbiological characterization of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 25, 786-792.

Bricout, A., Carlier, A., Lanau, A., Harison, R., Hui, S. (2009). Les spécificités de la logistique alimentaire. Rapport Logistique Agro-alimentaire, Université de Picardie Jule Verne (UPJV), Institute National Supérieur des Sciences et Techniques, Saint-Quentin, 30 p.

Brock, T. D. (1987). The study of microorganism in situ: progress and problem. *Symposium of Society for General Microbiology*, 41, 1-17.

Brunk, C.F., & Eis, N. (1998). Quantitative measure of small-subunit rRNA gene sequences of the kingdom *Korarchaeota*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 5064-5066.

Bruns, T. D., Fogel, R., White, T. J., & Palmer, J. D. (1989). Accelerated evolution of a false-truffle from a mushroom ancestor. *Nature*, 339, 140-142.

Burns, J., McQuillan, M., Najran, P., & Woolfe, M. (2004). DNA techniques for tackling food misdescription. *European Food & Drink Review*, 1, 23-25.

C

Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., & Montel, M. C. (2006). Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 172-180.

Cantwell, M., Flores, M. J., & Trejo, G. A. (1992). Developmental changes and post-harvest physiology of tomatillos fruits (*Physalis ixocarpa* L.). *Scientia horticulturae*, 50, 59-70.

Carvalho, L. M. J., Borchetta, R., Silva, É. M. M., Carvalho, C. W. P., Miranda, R. M., & Silva, C. A. B. (2008). Effect of enzymatic hydrolysis on particle size reduction in lemon juice (*Citrus limon* L.), cv. Tahiti, Braz. *J. Food technology*, 9, 277-282.

Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M., & Ryan, T. (2001). Antibacterial activity of raspberry cordial *in vitro*. *Research in Veterinary Science*, 71, 1-5.

Cebeci, Z., Alemdar, T. & Guney, O. I. (2008). Designing a Conceptual Production Focused and Learning Oriented Food Traceability System. *In Proc. of 4th Int. Conf. On Information and Communication Technologies in Bio and Earth Sciences*, (Ed. T. Tsiligiridis). (ISBN 978-960-387-725-7). 18-20 Sep 2008, Agric. Univ. Of Athens, Greece. pp 206-213.

Chang, H. C., Leaw, S. N., Huang, A. H., Wu, T. L., & Chang, T. C. (2001). Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of clinical microbiology*, 39, 3466-3471.

Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Lui, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pulluulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 793-804.

Chiang, H. C., Jaw, S. M., & Chen, P. M. (2002). Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 12, 1155-1162.

Chiang, H. C., Jaw, S. M., Chen, C. F., & Kan, W. S. (2002). Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Research*, 12, 837-843.

- China, B., Clinquart, A., & Daube, G. (2004).** Développement d'un système de traçabilité génétique chez le porc basé sur le séquençage de régions riches en SNP. *Journées Recherche Porcine*, 36, 289-292.
- Choi, E. M., & Hwang, J. K. (2005).** Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. *Phytother Research*, 19, 382-386.
- Cocolin, L., & Mills, D. A. (2003).** Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: a comparison of culture-dependent and culture-independent methods. *American journal of enology and viticulture*, 54, 125-130.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2002a).** An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12, 407– 411.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000).** Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189, 81-87.
- Cocolin, L., Heisey, A., & Mills, D. A. (2001).** Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *American journal of enology and viticulture*, 52, 49-53.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., & Comi, G. (2004).** The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 83-91.
- Cocolin, L., Manzano, M., Rebecca, S., & Comi, G. (2002b).** Monitoring of yeast population changes during a continuous wine fermentation by molecular methods. *American journal of enology and viticulture*, 53, 24–27.
- CODEX STAN 226-2001**, Amendement 1-2005. Norme Codex pour les Physalis.
ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/FreshFruitsVeg/FFV_2007_FR.pdf
(Accédé Février 2007)
- Codron, J. M., Aubert, M., & Bouhsina, Z. (2009).** Les relations de dépendance dans le commerce international de fruits et légumes frais. Le cas des exportations du Chili vers l'Europe Troisième Journée de Recherches en Sciences Sociales INRA-SFER-CIRAD, 09 - 11 December, Montpellier, France.
http://www1.montpellier.inra.fr/bartoli/moisa/bartoli/download/moisa2009_pdf/WP_6_2009.pdf (Accédé Décembre 2009)
- Colombian Banco de Datos (2000).** Physalis economics in Colombia.
<http://www.nocheyniebla.org/> (Accédé Avril 2000)

Commission du codex alimentarius « ALINORM 04/27/38 » (2004). Rapport de la ciquième session du groupe intergouvernemental spécial sur l'alimentation animale, 29 p.

www.codexalimentarius.net/download/report/649/al04_38f.pdf (Accédé Mai 2004)

Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., & Moschetti, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 414-420.

Cousins, R.I. (1996). Zinc, in: Zeigler E. E., & Filer L. J. (Eds.), Present knowledge in nutrition, ILSI Press, Wash. D.C., U.S.A., 293 p.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.

D

Deak, R., Bodai, L., Aarts H. J., & Maraz, A. (2004). Development of a novel, simple and rapid molecular identification system for clinical *Candida* species. *Medical Mycology*, 42, 311-318.

Dendis, M., Horyath, R., Michalek, J., Ruzicka, F., Grijalva, M. B., & Benedik, J. (2003). PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clinical microbiology and infection*, 9, 1191-1202.

Dietary Reference Intakes “DRIs” (2004). Dietary reference intakes of nutrient-based reference values, established by Nutr. Board Ntl Acad. Sci., Ntl. Acad.Press, Wash. D.C.

<http://www.nap.edu> (Accédé Mars 2004)

Díez, B., Pedrós-Alio, C., & Massana, R. (2001b). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2932-2941.

Díez, B., Pedrós-Alio, C., Marsh, T. L., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2942-2951.

Dóka, O., & Bicanic, D. (2002). Determination of total polyphenolic content in red wines by means of the Folin-Ciocalteu colorimetry assay, *Analytical Chemistry*, 74, 2157–2161.

- Dolci P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Bertolino, M., & Cocolin, L. (2010).** Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 71-75.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998).** Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*, 148, 1667-1686
- Duke, J. A., & Ayensu, E. S. (1985).** *Medicinal Plants of China Reference Publications*, Inc., Algonac, Michigan, 705 p.
- Durand, N., El Sheikha A. F., Fontana Tachon, A., & Montet, D. (2009).** Dynamics and Biodiversity of microorganisms (fungi, yeast and bacteria) by PCR-DGGE, influencing OTA production on coffee beans. *International Society for Mycotoxicology (ISM) Conference* entitled: "Worldwide Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains", Tulln/Vienna, Austria, 9-11 September 2009.
- Dutton, C. M., Paynton, C., & Sommer, S. (1993).** General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Research*, 21, 2953-2954.

E

- Egan, H., Kirk, R.S., & Sawyer R. (1981).** Pearson's chemical analysis of foods, 8th ed., Churchill Livingstone, London, U.K, pp 591.
- Eicher, S. D., Wesley, I. V., Sharma, V. K., & Johnson, T. R. (2010).** Yeast cell-wall products containing 3-glucan plus ascorbic acid affect neonatal *Bos taurus* calf leukocytes and growth after a transport stressor. *Journal of animal science*, 88, 1195-1203.
- Eichner, C. A., Rainer, W. E., Timmis, K. N., & Wagner-Döbler, I. (1999).** Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 102-109.
- El Sheikha A. F., Sainz de Los Terreros, A., Nabet, C., Montet, D., Larroque, M., & Pelissier, Y. (2008b).** Le Coqueret du Pérou (*Physalis peruviana* L.). **1st Prize of Ethnopharmacology and Ethnopharama laboratory.** *10th International Symposium of Aromatherapy and Medicinal Plants*, Grasse, 11-13 April 2008.
- El Sheikha, A. F. (2004).** Technological, Chemical and Microbiological Studies on Some Packed Foods. M.Sc Thesis, Faculty of Agriculture, Minufiya University, Egypt, 174 p.

El Sheikha, A. F. (2009). Physalis Fruits from Paradise. **1st Prize for Poster.** *Trace 5th Annual Meeting and International Conference* entitled: "TRACE in practice (New methods and systems for confirming the origin of food)", Freising near Munich, 1-3 April 2009.

El Sheikha, A. F. (2009). Shea Tree Fruits The Gold of Women. **1st Prize for Poster.** *Trace 5th Annual Meeting and International Conference* entitled: "TRACE in practice (New methods and systems for confirming the origin of food)", Freising near Munich, 1-3 April 2009.

El Sheikha, A. F. (2010). Determination of the geographical origin of fruits by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *Journal of Life Sciences.* 4, 9-15.

El Sheikha, A. F., & Montet, D. (2010). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: An application to Physalis fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits.* (In press)

El Sheikha, A. F., & Montet, D. (2010). New Strategies of Traceability for Determining the Geographical Origin of Foodstuffs: Creation of a biological Bar-Code by PCR-DGGE. News on TRACE website. (10 January 2010).

<http://trace.eu.org/admin/news/file/Article%20TRACE-Cirad-Jan2010.pdf> (Accédé Janvier 2010)

El Sheikha, A. F., Bouvet, J-M, & Montet, D. (2010). Diversity of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. Paper presented at: *17th World Congress of the International Commission of Agriculture Engineering (CIGR).* Symposium on Nanotechnologies Applied to Biosystems Engineering and the Environment, Section VI: Postharvest Technology and Process Engineering. Hosted by the Canadian Society for Bioengineering (CSBE/SCGAB), 13-17 June 2010. Québec City, Canada.

El Sheikha, A. F., Bouvet, J-M, & Montet, D. (2010a). Novel molecular fingerprinting for the geographical origin of fruits. *Mansoura Journal of Biology.* (Accepted)

El Sheikha, A. F., Bouvet, J-M, & Montet, D. (2010c). Biological bar-code for the determination of geographical origin of fruits by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods.* (In press)

- El Sheikha, A. F., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G., & 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. F., Métayer, I., & Montet, D. (2010b).** A Biological bar-code for determining the geographical origin of fruit by using 28S rDNA fingerprinting of fungi communities by PCR-DGGE: an application to *Physalis* fruits from Egypt. *Food Biotechnology*. (In press)
- El Sheikha, A. F., Piombo, G., Goli, T., & Montet, D. (2010e).** Main composition of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) fruits juice from Egypt. *Fruits*, 65, 255-265.
- El Sheikha, A. F., Ribeyre, F., Larroque, M., Reynes, M., & Montet, D. (2009b).** Quality of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) juice packed in glass bottles and flexible laminated packs during storage at 5°C. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* (AJFAND), 9, 1388-1405.
<http://www.ajfand.net/Issue27/PDFs/El-Sheikha3150.pdf> (Accéder Septembre 2009)
- El Sheikha, A. F., Zaki, M. S., Montet, D., Larroque, M., & Pelissier, Y. (2008a).** Cerise de Terre (*Physalis pubescens* L.). 10th International Symposium of Aromatherapy and Medicinal Plants, Grasse, 11-13 April 2008.
- El Sheikha, A. F., Zaki, M., Bakr, A., El Habashy, M., & Montet, D. (2008).** Physico-chemical properties and biochemical composition of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) fruits. Global Science Books Ltd., UK, *FOOD*, 2, 124-130.
- El Sheikha, A. F., Zaki, M., Bakr, A., El Habashy, M., Montet, D. (2010d).** Biochemical and sensory quality of *Physalis* (*Physalis pubescens* L.) juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 541-555.
- Ercolini, D. (2004).** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297-314.
- Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., & Coppola, S. (2008).** Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 164-170.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999).** Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal System Bacteriology*, 49, 329-337.

F

Facciola, S. (1990). *Cornucopia, a Source Book of Edible Plants*, Kampong Publications, Vista, 677 p.

FAO (2010). Projections à moyen terme de l'offre et de la demande de fruits tropicaux à l'horizon.

<ftp://ftp.fao.org/unfao/bodies/ccp/ba-tf/04/i0603f.pdf> (Accédé Mars 2010)

FAOSTAT (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics.

<http://faostat.fao.org/site/535/default.aspx#ancor> (Accéder Novembre 2010)

FAOSTAT (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics.

<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (Accéder Septembre 2010)

Fernandez-Gonzalez, M., Espinosa, J. C., Ubeda, J. F., & Briones, A. I. (2001). Yeasts present during wine fermentation: comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 634-638.

Ferrier, D. (1996). La protection des consommateurs. Dalloz, Paris, 120 p.

Fisher, S. G., & Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 80, 1579-1583.

Food Standards Agency "FSA" (2007). *What consumers want—A literature review*. Labelling and Packing. Labelling Research.

<http://www.food.gov.uk/foodlabelling/researchandreports/litreview> (Accéder Septembre 2007)

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Rorestier, N., Teyssier-Cuvelles, S., Gillet, F., Aragno, M., & Rossi, P. (2002). Statistic analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns: A review. *Environmental Microbiology*, 4, 634-643.

Füzesi, I., Mezőszentgyörgyi, D., & Herdon, M. (2009). Application of modern traceability systems and data storage technologies by Hungarian meat companies. In: 4th Aspects and Visions of Applied Economics and Informatics. March 26 - 27. 2009, Debrecen, Hungary.

Fuleki, T., Pelayo, E., & Palabay, R. B. (1995). Carboxylic acid composition of varietal juice produced from fresh and stored apples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 598-607.

G

Galeb, A. D. S., Wrolstad, R. E., & Mcdaniel, M. R. (2002). Composition and quality of clarified cantaloupe juice concentrate, *Journal of Food Processing and Preservation*, 26, 39-56.

Gatto, V., & Torriani, S. (2004). Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Annals of microbiology*, 54, 31-42.

Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & Van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of microbiological methods*, 38, 1-15.

GEOATLAS (2010). Cartes géographiques du Monde.

http://www.geoatlas.fr/fr/detailFR_cdrom.php?cdrom=7 (Accéder Décembre 2010)

GeoTraceAgri (2005). Geotraceability: an innovative concept for the qualification of crop production. Rapport final du projet GeoTraceAgri (GTA) IST-2001-34281.

http://www.geotraceagri.net/doc/GeoTraceAgri_Finalreport_EN.pdf (Accéder Mars 2005)

Golan, E., Krissoff, B., Kuchler, F., Nelson, K., Price, G., & Calvin, L. (2003). Traceability for Food Safety and Quality Assurance: Mandatory Systems Often Miss the Mark. *Current Agr., Food, & Resource Issues*, 4, 27-35.

Golan, E., Krissoff, B., Kuchler, F., Nelson, K., Price, G., & Calvin, L. (2004). Traceability in the U.S. Food Supply: Economic Theory and Industry Studies. Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Economic Report No. 830. March.

Gomes, N. C. M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N. G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L. & Smalla, K. (2003). Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3758–3766.

Gordon M. H., & Miller, L. A. D. (1997). Development of steryl ester analysis for the detection of admixtures of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 505-510.

Green, R., & Hy, M. (2002). La traçabilité : un instrument de la sécurité alimentaire. *Agroalimentaria*, 7, 19-28.

Griffiths, B. S., Ritz, K., Bardgett, R. D., Cook, R., Ekelund, F., Sørensen S. J., Bååth, E., Bloem, J., De Ruiter, P. C., Dolfing, J., & Nicolardot, B. (2000). Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos*, 90, 279-294.

GS1 Belgium & Luxembourg (2006). Specification GS1 pour l'identification et la traçabilité des fruits, légumes et pommes.

<http://www.gs1belu.org/files/Tracering-AGF%20FR.pdf> (Accéder Janvier 2006)

Guého, E., Kurtzman, C. P., & Peterson, S. W. (1990). Phylogenetic Relationships among Species of *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* as determined from Partial rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 60-65.

Guiraud, J. P. (2003). Microbiologie Alimentaire. Dunod/RIA, Paris, 615 p.

H

Hancock, J. M., Tautz, D., & Dover, G. A. (1988). Evolution of the Secondary Structures and Compensatory Mutations of the Ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol. Molecular Biology and Evolution*, 5, 393-414.

Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., & Molin, S. (1998). Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*, 26, 141-149.

Hassouna, N., Michot, B., & BacheHerie, J. P. (1984). The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 12, 3563-3583.

Hawksworth, D. L., & Mueller, G. M. (2005). Fungal communities: their diversity and distribution. In: Dighton J, Oudemans P, White J (eds) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 3rd edn. Marcel Dekker, New York, pp 27–37.

Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications*, 1, 34-38.

Health Notes (2002).

<http://www.healthnotes.com> (Accéder Juin 2002)

Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., & Wagner, M. (2001). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3122–3126.

Hernán-Gómez, S., Espinosa, J. C., & Ubeda, J. F. (2000). Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis. *FEMS microbiology letters*, 193, 45–50.

Herrera, C. M., & Pozo, M. I. (2010). Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. *Proceedings of the Royal Society*, 1-8. doi: 10.1098/rspb.2009.2252
<http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2010/02/05/rspb.2009.2252.full.pdf+html> (Accéder Février 2006)

Hesham, A. E. L., Khan, S., Liu, X. C., Zhang, Y., Wang, Z., & Yang, M. (2006). Application of PCR–DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, 23, 879–887.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & 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.

Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965-1978.

Hijmans, R. J., Guarino, L., Cruz, M., & Rojas, E. (2001). Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. Diva-gis. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 127, 15-19.

Hilborn, E. D., Mshar, P. A., Fiorentino, T. R., Dembek, Z. F., Barrett, T. J., Howard, R. T., & Carter, M. L. (2000). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and haemolytic uraemic syndrome associated with consumption of unpasteurized apple cider. *Epidemiology Infection*, 124, 31-36.

- Hobbs, J. E. (2004).** "Traceability in the Canadian Red Meat Sector: Do Consumers Care?". *Agribusiness*, 20, 397-415.
- Hugge, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., & Bergman, H. L. (1992).** *Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Ann Arbor, MI.
- Hunt C., & Herbei J. (1991).** Effects of dietary boron on calcium and mineral metabolism in the streptozotocin-injected, vitamin D3-deprived rat, *Magnesium and Trace Elements*, 10, 387-408.
- Hurtrel d'Arboval, L. H. J. (1875).** *Dictionnaire de médecine, de chirurgie et d'hygiène vétérinaire*. Baillière et fils, Paris, Paris, 650 p.

I

- Ibekwe, A. M., Papernik, S. K., Gan, J., Yates, S. R., Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2001).** Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3245-3257.
- INNOVKAR (2006-2011).** Innovative Tools and Techniques for Sustainable Use of the Shea Tree in Sudano-Sahelian zone. Project N° INCO-CT-032037.
<http://inco-innovkar.cirad.fr/project> (Accéder Juillet 2008)
- ISO 9000 (2007).** International Organization for Standardization. Quality Management Systems. Traceability in the feed and food chain - General principles and basic requirements for system design and implementation.
<http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ISO%2022005:2007> (Accéder Juillet 2007)
- Itoh, T., Tamura, T. & Matsumoto, T., (1974).** Sterols and methylsterols in some tropical and subtropical vegetable oils, *Oléagineux*, 5, 253-258.

J

- Januário, A. H., Rodrigues Filho, E., Pietro, R. C. L. R., Kashima, D. N., Sato, D. N., & França, S. C. (2002).** Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytother Research*, 16, 445-448.
- Joslyn, M. A. (1970).** Methods in food analysis, 2nd ed., Acad. Press Inc., Berkeley, Calif., USA.

Juck, D., Charles, T., Whyte, L. G., & Greer, C.W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 241-249.

K

Kamal-Eldin, A., & Andersson, R. A. (1997). Multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 375–380.

Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., & Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 65, 38-48.

Karch, H., Tarr, P. I., & Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International journal of medical microbiology*, 295, 405-418.

Kawai, M., Makino, B., Yamamura, H., Araki, S., Butsugan, Y., & Ohya, J. (2002). Cytotoxic activity of physalins and related compounds against HeLa cells. *Pharmazie*, 57, 348-350.

Khot, P. D., Ko, D. L., & Fredricks, D. N. (2009). Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1559-1565.

Kilcast, D., & Subramanian, P. (2000). *The Stability and Shelf-Life of Food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624-626.

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β 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, 3176-3181.

Kurokawa, M., Ochiai, H., Nagasaka, K., Neki, M., & Xu, H. (1993). Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus and measles virus in vitro and their herapeutic fficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research*, 22, 175-88.

Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomic of the yeasts. *Yeast*, 10, 1727-1740.

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek*, 73, 331-371.

L

Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J. J., Monnet, C., Dupont J., & Bouix M. (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1208-1218..

Lake, J. A. (1987). A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences: evolutionary parsimony. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 167- 191.

Laydon, N., Grove, J; F., & Pople, M. (1977). Insecticidal secondary metabolic products from the enomogenous fungus *Fusarium solani*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30, 216-223.

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 (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gel Electrophoresis). Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 233 p.

Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schäfer, H., & Stackebrandt, E. (1999). Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 255-267.

Leesing, R. (2005). Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poisons d'aquaculture lors de leur import/export. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 183 p.

Lerman, L.S., Fisher, S.G., Hurley, I., Silverstain, K., & Lumelsky, N. (1984). Sequence-determined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13, 399-423.

Li, X., Zhang, H., Wu, M., Zhang, Y., & Zhang, C. (2008). Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 619-625.

Llanos-Frutos, R., Fernandez-Espinar, M. T., & Querol, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85, 175-185.

Loftus, R. (2005). Food Control and Legislation Farm to Fork Traceability through DNA Technology.

<http://www.foodtech-international.com/papers/farmtofork.htm> (Accéder Octobre 2005)

Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., & Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23, 341–350.

López-Archilla, A. I., Marín, I., & Amils, R. (2001). Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microbial Ecology*, 41, 20-35.

M

Maila, M. P., Randima, P., & Cloete, T. E. (2006). Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Soil biology & biochemistry*, 38, 303-310.

Market News Service “MNS” (2000). Fruits et Légumes Européens Rapport. Centre du Commerce International (ITC), l'ONU à Genève, Suisse.

Marshall, M. N., Cocolin, L., Mills, D. A., & VanderGheynst, J. S. (2003). Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 934-948.

Martins, C., & Wasko, A. P (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (ed). *Focus on Genome Research*,. Nova Science Publishers, Hauppauge, pp 289-318.

Masoud, W., Cesar, L. B., Jespersen, L., & Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast*, 21, 549-556.

Maukonen, J., & Saarela, H. (2009). Microbial communities in industrial environment. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 238-243.

Mauriello, G., Moio, L., Genovese, A., & Ercolini, D. (2003). Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition, and geographical origin of natural whey cultures used for traditional water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Journal Dairy Science*, 86, 486-497.

- McCracken, V. J., Simpson, J. M., Mackie, R. I., & Gaskins, H. R. (2001).** Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *Journal of Nutrition*, 131, 1862–1870.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999).** *Sensory Evaluation Techniques*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003).** Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR–denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7453–7461.
- Midorikawa, G. E. O., Pinheiro, M. R. R., Vidigal, B. S., Arruda, M. C., Costa, F. F., Pappas Jr, G. J., Ribeiro, S. G., Freire, F., & Miller, R. N. G. (2008).** Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 12–18.
- Miller, E. L. (1967).** Determination of the tryptophan content in feeding stuffs with particular reference to cereals, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18, 381–386.
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., & Cocolin, L. (2002).** Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4884–4893.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., & Herndl, G. J. (1999).** Optimization of terminal restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3518–3525.
- Möhlenhoff, P., Müller, L., Gorbushina, A. A., & Petersen, K. (2001).** Molecular approach to the characterization of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 169–173.
- Montet, D., & El Sheikha, A. F. (2010).** Universal biological bar-code for the determination of geographical origin of foodstuffs. *Mansoura Journal of Biology*. (Accepted)
- Montet, D., El Sheikha, A. F., Le Nguyen D. D., Condur, A., Métayer, I., & Loiseau, G. (2010).** Déterminer l'origine des aliments grâce à la biologie moléculaire. L'exemple de la PCR-DGGE. *Biofutur*, 307, 36–38.

- Montet, D., Le Nguyen, D. D., El Sheikha, A. F., Condur, A., Métayer, I., & Loiseau, G. (2008).** Application of PCR-DGGE in determining food origin: Cases studies of fish and fruits. Eds by Richard Glass, Wayne Martindale. Wellesbourne: AAB, *Aspects of Applied Biology*, 87, 11-22.
- Montet, D., Leasing, R., Gemrot, F., & Loiseau, G. (2004).** Development of an efficient method for bacterial diversity analysis: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: *Seminar on food safety and international trade*, Bangkok, Thailand.
- Moore, S., & Stein, W. H. (1963).** Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment, in: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol 6, Acad. Press, N.Y., U.S.A., pp 819-831.
- Moriconi, D. N., Rush, M. C., & Flores, H. (1990).** Tomatillo: A potential vegetable crop for Louisiana. In: J. Janick and J. E. Simon (eds.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR., pp 407-413.
- Moustufa, B. M. (2002).** Chemical and technological studies on some vegetables and fruits juices. PhD Thesis, Faculty of Agriculture, Moshtohor, Zagazig University (Benha Branch), Egypt, 277 p.
- Müller, F. M., Werner, K. E., Kasai, M., Francesconi, A., Channock, S. J., & Walsh, T. J. (1998).** Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1625-1629.
- Mueller, G. M., & Bills, G. F. (2004).** Introduction. In: Mueller G. M., Bills G. F., Foster M. S. (eds) *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp1-4.
- Musters, W., Boon, K., Van der Sande, C. A. F. M., Van Heerikhuizen, H., & Planta, R. J. (1990).** Functional analysis of transcribed spacerr of yeast ribosomal DNA. *EMBO Journal*, 9, 3989-3996.
- Muyzer, G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 317-322.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., & Wawer, C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D., & De Bruijn, F. J. (Eds). *Molecular Microbiol Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-23.

Myers, R. M. Fischer, S. G., Lerman, L. S., & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13, 3131-3145.

Myers, R. M., Maniatis, T., & Lerman, L. S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 155, 501-527.

N

Nakamura, H., Kaneko, S., & Yamaoka, Y. (1998). PCR-SSCP analysis of the ribosomal DNA ITS regions of the willow rust fungi in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65, 102-109.

NCBI : National Center for Biotechnology Information databases.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Accéder Décembre 2010)

Nicolaisen, M. H., & Ramsing, N. B. (2002). Denaturing gradientgel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 50, 189-203.

Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arné, P., & Guillot, J. (2007). Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 86-95.

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22, 271–284.

Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods.. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 168–186.

O

Omar, A. M. (1998). Technological studies on fruit juice concentrate, Fac. Agric., Zagazig Univ., Thesis, Egypt, 225 p.

Organisation Mondiale de la Santé Animale "OIE" (2010). La sécurité sanitaire des aliments.

http://www.oie.int/fr/ressources/FOOD_FR_FS%20.pdf (Accéder Décembre 2010)

P

Peakall, D. B., Walker, C. H., & Migula, P. (1999). *Biomarkers: Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe*, p 323. Kluwer Academic Publishers, London.

Pina, C., Teixeira, P., Leite, P., Villa, M., Belloch, C., & Brito, L. (2005). PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in carbonated orange juice production chain. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1107-1114.

Pinto, P. M., Resende, M. A., Koga-Ito, C. Y., Ferreira, J. A., & Tendler, M. (2004). rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Canadian journal of microbiology*, 50, 514-20.

Portetelle, D., Haezebroeck, V., Mortiaux, F., & Renaville, R. (2000). Traçabilité dans la filière animale. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 4, 233-240.

Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analysis the yeast ecology of wines grapes. *FEMS Yeast Research*, 4, 865-877.

R

Raghava R. P., & Nisha R. (1990). Carotenoid content of husk tomato under the influence of growth regulators and gamma rays, *Indian Journal of Plant Physiology*, 33, 87-89.

Ranganna, S. (1979). Manual of analysis of fruit and vegetable products, 2nd ed., Tata McGraw- Hill Publ. Co., Ltd., New Delhi, India, 634 p.

Raspor, P. (2002). *Handbook for Establishment and Conducting HACCP System*. XIV, p 598, Slovenski institut za kakovost in meroslovje: Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana.

Raspor, P. (2003). Primary identifiers of food items using bio(logical) markers. In *Managing the complexities of traceability for quality, safety and profit: FoodTracE: conference proceedings*, p 5–7. European Commission Concerted, Action Project, Brussels.

Raspor, P. (2004). Bio-markers as primary identifiers as needed for food safety and traceability of food items. In: *2nd Central European Congress on Food*, April 2004, Budapest, Hungary, p 1-11, CEFood Congress. Consumers, Nutrition, Safety, Technology.

Recommended Dietary Allowances “RDAs” (1989). Recommended intakes of nutrients that are sufficient to meet the needs of almost all individuals (97: 98%) of similar age and gender. These are established by Nutrition Board of National Academy of Science, 10th Ed., National Academy Press, Washington, DC.

Règlement CE N° 178/2002 du Parlement Européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés Européennes*, 24 p.

Règlement CE N° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 26 p.

Règlement CE N° 36/2000 du Parlement européen et du Conseil du 23 juin 2000 relative aux produits de cacao et de chocolat destinés à l'alimentation humaine. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 7 p.

Reynal, J. (1873). *Traité de la police sanitaire des animaux domestiques*. Asselin, Paris, 1012 p.

Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3417-3418.

Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomes, A., & Weiss, J. (2007). Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*, 18, 33-39.

Ruano, G., & Kidd, K. K. (1992). Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *PCR Methods and Applications*, 2, 112-116.

Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). Bacteria. In: *Sherris Medical microbiology*, 4th ed, Mc Gram Hill ISBN 0838585299.

S

Saad, D. S., Kinsey, G. C., Kim, S., & Gaylarde, C. C. (2004). Extraction of genomic DNA from filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings. *International biodeterioration & biodegradation*, 54, 99-103.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological research*, 157, 1-8.

Sage, L., Garon, D., & Seigle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 5764–5768.

Sandhu, G., Kline, B. C., Stockman, L., & Roberts, G. D. (1995). Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2913-2919.

Saracci, R. (1997). Comparing measurements of biomarkers with other measurements of exposure. In *Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology*. Toniolo P, Boffe P, Shuker DEG, Rothman N, Hulka B, Pearce N eds. IARC Scientific Publications No. 142, pp 303–312, Lyon.

Schäfer, H., & Muyzer, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, 30, 425-452.

Schulte, P. A., & Waters, M. (1999). Using molecular epidemiology in assessing exposure for risk assessment. *Annals of the New York Academy of Sciences USA*, 895, 101–111.

Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9, 83-89.

Serra, R., Braga, A., & Venancio, A. (2005). Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156, 515–521.

Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L.S., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragment by polymerase

chain reaction results in improved detection of single-base changes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 232-236.

Shin, J. H., Nolte, F. S., & Morrison, C. J. (1997). Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1454-1459.

Simpson J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R., & Mackie, R. I.. (1999). Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 167-179.

Simpson, J. M., McCracken, V. J., Gaskins, H. R., & Mackie, R. I. (2000). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuterii* strain MM53. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4705–4714.

Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Van Elsas, J.D., & Wernars, K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65, 2614–2621.

Soares, M. B., Brustolim, D., Santos, L. A., Bellintani, M. C., Paiva, F. P., Ribeiro, Y. M., Tomassini, T. C., & Ribeiro Dos Santos, R. (2006). Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6, 408-414.

Souza Monteiro, D. & Caswell, J. A. (2004). The Economics of Implementing Traceability in Beef Supply Chains: Trends in Major Producing and Trading Countries. Paper presented at *NAREA Annual Meeting*, Halifax, Nova Scotia, Canada.

Staley, J., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganism in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39, 321-346.

Stary, F. (1983). *Poisonous Plants*. Hamlyn Colour Guides, London, ISBN 0-600-35666-3.

Stolp, H. (1988). *Microbiale ecology: organisms, habitats, activities*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M. (2008). Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 184-189.

Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 625-630.

T

Tanner, M., Goebel, B. M., Dojka, M. A., & Pace, N. R. (1998). Specific ribosomal sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3110-3113.

Taussky, H. H., & Shorr, E. (1953). A micro-colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus, *Journal of Biological Chemistry*, 202, 675-685.

Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., & Swings, J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 220-226.

Tnah, L. H., Lee, S. L., Ng, K. K. S., Tani, N., Bhassu, S., & Othman, R. Y. (2009). Geographical traceability of an important tropical timber (*Neobalanocarpus heimii*) inferred from chloroplast DNA. *Forest Ecology and Management*, 258, 1918-1923.

Tortora, G.J. (2010). Functional Anatomy of Prokaryotic and Eukaryotic Cells. In: *Microbiology An Introduction*. 8th, 9th, 10th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004, 2007, 2010, pp 77-112.

U

UNCTAD (2006). United Nations Conference on Trade and Development. Organ of the UN. UNCTAD secretariat based on the statistics of the United Nations Food and Agriculture. Market information in the field of commodities "Shea Tree Fruits", N° 2885.

<http://www.unctad.org/infocomm/francais/karite/descript.htm> (Accéder Mars 2006)

United Nations Commodity Trade Statistics Database "UN Comtrade" (2006). Shea nuts (Karité nuts).

<http://comtrade.un.org/db/mr/rfCommoditiesList.aspx?px=H1&cc=120792> (Accéder Janvier 2006)

USDA (2006). National Nutrient Database for Standard Reference NDB No.09152, 09160 and 09206, Wash. D.C.

[http:// www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl) (Accéder Décembre 2006)

V

Vainio, E. J., & Hantula, J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 104, 927-936.

Vallaes, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., & Soulas, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 279-285.

Van Elsas, J. D., Duarte, G. F., Keijzer-Wolters, A., & Smit, E. (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 133–151.

Van Hannen, E. J., Mooij, W., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., & Laanbroek, H. J. (1999). Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65, 2478–2484.

Vaughan, E. E., Mollet, B., & de Vos, W. M. (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Current opinion in biotechnology*, 10, 505-510.

Vietmeyer, N. D. (1986). Lesser-know plants of potential use in agriculture and forestry. *Science*, 232, 1379-1384.

Von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229.

W

- Walsh, T. J., & Dixon, D. M. (1996).** Mycoses profondes, dans baron S et autres eds. En: *Medical Microbiology de baron* (par l'intermédiaire de l'étagère de NCBI), 4ème E-D., Univ de branche médicale du Texas. ISBN 0-9631172-1-1.
- Walsh, T. J., Francesconi, A., Kasai, M., & Chanock, S. J. (1995).** PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 3216-3220.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., & Bateson, M. M. (1998).** A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1353-1370.
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990).** 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345, 63-65.
- Wardlaw, G. M., & Kessel, M. W (2002).** Minerals. In: Lynne M. M (Ed) *Perspectives in Nutrition* (5th Edn), McGraw-Hill Publishing Co., Ltd., International Edition, NY, USA, pp 453-498.
- Wassef, H. H. (2004).** Food habits of the Egyptians: newly emerging trends. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 10, 898-915.
- White, E. (1997).** Effects of biomarker measurement error on epidemiological studies. In: *Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology*. Toniolo P, Boffe " a P, Shuler DEG, Rothman N, Hulka B, Pearce N, eds, pp 73–93, IARC Scientific Publications No. 142, Lyon.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, (eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, California.
- Whittaker, R. H. (1969).** New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163, 150-60.
- Wikström, P., Andersson, A. C., & Forsman, M. (1999).** Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 131-139.
- Wilson, I. G. (1997).** Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221–271.

Woolfe, M. L., & Primrose, S. (2004). Food Forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22, 222–226.

Wu, S. J., Ng, L. T., Huang, Y. M., Lin, D. L., Wang, S. S., Huang, S. N., & Lin, C. C. (2005). Antioxidant Activities of *Physalis peruviana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 963-966.

Z

Zeid, M. H. M. (1996). Technological studies on some fruit and vegetable products. Fac. Agric., Zagazig Univ., Ph D Thesis, Egypt, 265 p.

Zinser, E., & Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11, 493–536.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3854-3859.

Zuckerland, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., & Vogel, H. J. (Eds). *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, pp 97-166.

ANNEXES

ANNEXE 1

Préparation des réactifs pour l'extraction d'ADN*Tampon Tris-EDTA (TE) à pH 8.0*

Le tampon Tris-HCl permet de maintenir le pH nécessaire à l'activité des enzymes de lyse cellulaire et l'EDTA est un chélateur des ions nécessaire à l'activité des DNases bactériennes. Il est composé des solutions suivantes : 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (Promega, France) et 1,0 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France). Ce tampon est stérilisé à 121°C pendant 15 min.

Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 50 X à pH 8,3 (Eppendorf, Allemagne)

Il est composé des solutions suivantes : 2M Tris-Acétate pH 8,3 et 0,05 M EDTA pH 8,3. Le tampon est dilué avec de l'eau distillée 50 fois avant usage.

Solution de lysozyme 25 mg/mL

25 mg de Lysozyme (Eurobio, France) sont solubilisés dans 1 mL d'eau pure (Eppendorf, Allemagne) et conserver à -20°C.

Solution de protéinase K 20 mg/mL

20 mg de Protéinase K (Eurobio, France) sont solubilisés dans 1 mL d'eau pure (Eppendorf, France) et conserver à -20°C.

Solution de SDS (Dodecyl sulfate de sodium) 20%

20 g de Dodecyl sulfate de sodium (Fluka, Allemagne) sont solubilisés dans 100 mL d'eau stérile (qsp).

Solution de NaCl 3M

175,32 g (3M) de NaCl (Panreac, Espagne) sont solubilisés dans 1 L d'eau distillée (qsp). La solution finale est autoclavée à 121°C, 15 min.

Solution de MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2%

2 g de MATAB (Fluka, Allemagne) solubilisés dans 100 mL d'une solution de NaCl 3M.

Mélange de Phénol/ Chloroforme/ Alcool isoamylique

Ce mélange d'extraction des ADN est préparé selon les proportions volumiques suivantes : Phénol (Fluka, Allemagne) 25mL/Chloroforme (Carlo Erba, France) 24mL/Alcool isoamylique (Panreac, Espagne) 1mL.

Mélange Chloroforme/ Alcool isoamylique

Ce mélange d'extraction des ADN est préparé selon les proportions volumiques suivantes : Chloroforme (Carlo Erba, France) 24 mL/Alcool isoamylique (Panreac, Espagne) 1 mL.

Solution d'acétate de sodium 3M, pH 5,2

246,09 g (3M) de CH₃COONa (Panreac, Espagne) sont solubilisés dans 1L d'eau distillée ajustée à pH 5,2 par de l'acide acétique. La solution est autoclavée à 121°C, 15 min.

Eau peptonnée tamponée (bioMérieux, France)

Bouillon utilisé pour récupérer des flores microbiennes totales de fruit afin de réaliser une extraction d'ADN.

Préparation : Verser 25,5 g de milieu déshydraté dans 1 L d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 20 min à 121°C à l'autoclave.

Composants	g/L
Peptone de caséine et de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5
Di-sodium hydrogénophosphate	9
Potassium di-hydrogénophosphate	1,5
pH 7,0	

ANNEXE 2

Protocole pour la purification de l'ADN

a. A partir d'un gel de DGGE

1. Exciser la bande d'ADN à partir du gel de DGGE et transférer dans un microtube Eppendorf.
2. Ajouter 100µL du tampon TE au fragment du gel. Incuber pendant la nuit à 4°C (élution passive). Transférer 100µL de la phase aqueuse dans un nouveau microtube Eppendorf.

A partir de cette étape:

3. Ajouter 1mL de résine. Vortexer pendant 20 sec pour bien mélanger.
4. Pour chaque échantillon, préparer une mini colonne Wizard. Enlever et séparer le piston à part de la seringue. Relier la seringue à la partie Luer-Lok de chaque mini colonne.
5. Pipeter le mélange résine/ADN dans la seringue. Insérer le piston lentement, et pousser doucement le produit à travers la colonne.
6. Détacher la seringue de la mini colonne et enlever le piston de la seringue. Rattacher la seringue à la mini colonne. Pipeter 2 mL d'isopropanol 80% dans la seringue.
7. Insérer le piston et pousser doucement à travers la colonne.
8. Enlever la seringue et transférer la colonne sur un microtube de 1,5 mL. Centrifuger la colonne à 10.000 g pendant 2 min.
9. Transférer la colonne sur un microtube Eppendorf neuf.
10. Ajouter 40 µL d'eau stérile et attendre 15 min. Centrifuger le microtube à 10 000 g pendant 20 sec.
11. Repasser les 40 µL dans la colonne. Attendre 1 min et centrifuger à 10 000 g pendant 20 sec.
12. Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C.

ANNEXE