
Université de Lille (Faculté des Sciences et Technologies)
&
Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech

Thèse

Présentée par Barbara FIFANI

Pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Lille en Biotechnologies agroalimentaires sciences de
l'aliment physiologie,

Docteur de l'Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech en sciences
agronomiques et ingénierie biologique

Développement de stratégies de coculture favorisant l'amensalisme ou la coopération entre les agents de biocontrôle *Bacillus velezensis* et *Trichoderma harzianum*

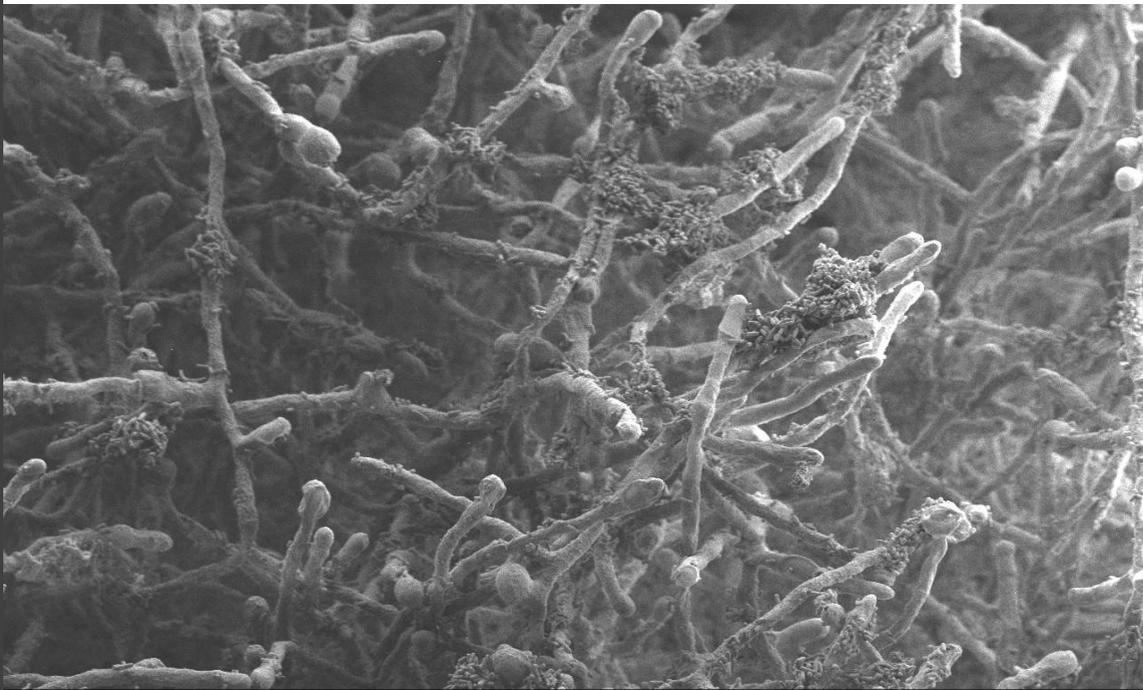
Préparée à l'Institut Charles Viollette et au TERRA Teaching and Research Centre
dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche transfrontalière BioEcoAgro No 1158

Soutenue le 20 Décembre 2021 devant le Jury composé de :

Vincent PHALIP	Université de Lille, France	Directeur
Frank DELVIGNE	Université de Liège, Belgique	Directeur
Philippe JACQUES	Université de Liège, Belgique	Directeur
Marie-Laure FAUCONNIER	Université de Liège, Belgique	Présidente
Florence FONTAINE	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Rapportrice
Stéphane DECLERCK	Université Catholique de Louvain, Belgique	Rapporteur
Aurélie DEVEAU	Université de Lorraine, France	Examinatrice
Marc ONGENA	Université de Liège, Belgique	Examineur

**Développement de stratégies de coculture
favorisant l'amensalisme ou la coopération
entre les agents de biocontrôle**
Bacillus velezensis et *Trichoderma harzianum*

Barbara FIFANI



Promoteurs :

Université de Lille : Vincent PHALIP

Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech : Frank DELVIGNE, Philippe JACQUES

Année civile : 2021

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

Et

UNIVERSITÉ DE LILLE (FRANCE)
SCIENCES TECHNOLOGIES (ST)

**Développement de stratégies de coculture
favorisant l'amensalisme ou la coopération
entre les agents de biocontrôle
Bacillus velezensis et *Trichoderma harzianum***

Barbara FIFANI

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur de
l'Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech en sciences agronomiques et
ingénierie biologique et de l'Université de Lille en Biotechnologies agroalimentaires
sciences de l'aliment physiologie

Promoteurs :

Université de Lille : Vincent PHALIP

Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech : Frank DELVIGNE, Philippe JACQUES

Année civile : 2021

« Give me six hours to chop down a tree and I will
spend the first four sharpening the axe. »

Abraham Lincoln

Résumé

La compréhension des mécanismes qui régissent les interactions entre les microorganismes du sol est primordiale pour le développement de nouveaux produits de biocontrôle basés sur ces microorganismes. Le champignon *Trichoderma harzianum* IHEM5437 et la bactérie *Bacillus velezensis* GA1, productrice de trois familles de lipopeptides, les surfactines, les fengycines et les iturines, sont exploités pour leur potentiel dans la lutte contre les phytopathogènes. Dans ce travail, différentes stratégies de coculture de ces deux microorganismes ont été testées afin de déterminer leur influence sur les interactions entre ces derniers. L'inoculation au même moment des deux souches dans un milieu riche contenant tous les éléments nécessaires à leur croissance, conduit au développement de la bactérie au détriment du champignon, grâce à son rythme de croissance plus rapide et surtout à la production des lipopeptides antifongiques qui inhibent la croissance du *Trichoderma*. L'utilisation de mutants incapables de produire l'un ou l'autre de ces lipopeptides a permis de montrer que cette activité antifongique dirigée contre *Trichoderma* est principalement due à l'iturine et à la fengycine. L'inoculation séquentielle de *Trichoderma* suivi par *Bacillus* permet de résoudre partiellement ce problème. Toutefois, dans cette approche, la production de lipopeptides par *B. velezensis* GA1 persiste et finit par interférer avec la croissance de *Trichoderma*. Également, le développement préalable du champignon entraîne un épuisement des nutriments qui impacte la croissance de *Bacillus*. L'utilisation d'un milieu contenant du nitrate comme seule source d'azote modifie complètement les interactions entre les deux partenaires. Dans ces conditions de coculture, une dépendance nutritionnelle entre le champignon et la bactérie a été observée. En effet, *Bacillus velezensis*, est incapable de se développer seul sur ce type de milieu suite à l'absence dans son génome du gène codant la nitrite reductase qui permet la transformation du nitrate en nitrite. *Trichoderma*, dont la croissance est favorisée en présence de nitrate, produit après 5 jours de culture des composés azotés assimilables par la bactérie, permettant, donc, la croissance de cette dernière. Par ailleurs, dans ces conditions de coculture, l'expression des gènes qui codent pour les synthétases nonribosomiques impliquées dans la synthèse des lipopeptides est réprimée. Cette répression lève l'inhibition de croissance du *Trichoderma* et permet donc dans la durée un développement des deux souches en coculture. Enfin, la coopération observée entre ces deux microorganismes nécessite leur présence en coculture car un surnageant de culture de *Trichoderma* seul obtenu dans ce même milieu avec nitrate, ne provoque pas de répression de l'expression de ces gènes. Ces travaux ont donc montré l'existence d'un dialogue complexe entre *Trichoderma harzianum* et *Bacillus velezensis* en présence de nitrate qui requiert d'être décrypté afin d'évaluer ses potentialités d'exploitation dans des applications de biocontrôle des maladies des plantes.

Abstract

Understanding the mechanisms that govern interactions between soil microorganisms is essential for the development of new biocontrol products based on these microorganisms. The fungus *Trichoderma harzianum* IHEM5437 and the bacterium *Bacillus velezensis* GA1, producer of three families of lipopeptides, surfactins, fengycins and iturins, are exploited for their potential in the control of phytopathogens. In this work, different coculture strategies of these two microorganisms were tested in order to determine their influence on the interactions between the cocultivated species. The inoculation at the same time of the two strains in a rich medium containing all the required elements for their growth leads to the development of the bacteria that inhibits the growth of the fungus, thanks to its faster growth rate and especially to the production of antifungal lipopeptides. The use of mutants unable to produce either of these lipopeptides has shown that this antifungal activity against *Trichoderma* is mainly due to iturin and fengycin. Sequential inoculation of *Trichoderma* followed by *Bacillus* partially resolves this problem. However, in this approach, the production of lipopeptides by *B. velezensis* GA1 persists and eventually interferes with the growth of *Trichoderma*. Also, the prior development of the fungus leads to a depletion of nutrients which impacts the growth of *Bacillus*. The use of a medium containing nitrate as the sole source of nitrogen completely changes the interactions between the two partners. Under these coculture conditions, a nutritional dependence between the fungus and the bacteria was observed. In fact, *Bacillus velezensis* is unable to develop on its own in this type of medium due to the absence in its genome of the gene encoding nitrite reductase which allows the transformation of nitrate into nitrite. *Trichoderma*, which growth is favored in the presence of nitrate, produces after 5 days of culture of nitrogen compounds which can be assimilated by the bacteria, thus allowing the growth of the latter. Furthermore, under these coculture conditions, the expression of the genes encoding for the nonribosomal synthetases involved in the synthesis of lipopeptides is repressed. This repression removes the inhibition of growth of *Trichoderma* and therefore allows the development of the two strains in coculture over time. Finally, the cooperation observed between these two microorganisms requires their presence in coculture because a culture supernatant of *Trichoderma* alone obtained in this same medium with nitrate, doesn't lead to the repression of the expression of these genes. This work has therefore shown the existence of a complex dialogue between *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* in the presence of nitrate which needs to be deciphered in order to assess its potential for exploitation in plant disease biocontrol applications.

Remerciements

Cette section “remerciements” ne sera pas suffisante pour exprimer toute ma gratitude envers les personnes qui ont rendu la finalisation de ce projet de thèse possible. Que ce soit au niveau scientifique ou personnel, cette expérience transfrontalière n’a pu être qu’enrichissante. En effet, l’opportunité de travailler dans deux laboratoires m’a permis de côtoyer beaucoup de personnes de part et d’autre de la frontière, qui sont devenues ma motivation pour prendre le train à 6 h le matin quand mon travail m’imposait des déplacements entre les laboratoires.

Dans un premier temps, je souhaite remercier les membres du jury, Florence Fontaine, Aurélie Deveau, Stéphane Declerck, Marc Ongena et la présidente Marie-Laure Fauconnier, pour l’évaluation de mon travail.

Dans un second temps, j’adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse Frank Delvigne, Vincent Phalip et Philippe Jacques qui, par leur expertise et leurs connaissances scientifiques, m’ont accompagné ces 4 dernières années. Bien que vous m’apportiez tout les 3 un soutien en continu, chacun a pu se démarquer pendant une période de ma thèse. Merci Frank pour ton suivi au démarrage de ma thèse, tu m’as permis de me lancer dans le monde de la recherche avec plein d’interaction et de cross-feeding, pas qu’entre les microbes mais aussi avec l’équipe. Vincent, tu as pris le relais quand j’ai migré vers l’ICV. Merci pour ton implication, et pour m’avoir aidé à résoudre tous les obstacles scientifiques et administratifs que j’ai eus à surmonter. J’ai pu compter sur toi à chaque instant. Philippe, grâce à toi j’ai eu l’opportunité de déposer un brevet et même de rédiger un projet, et je t’en remercie. Je ne te cache pas que c’étaient les tâches les plus longues et compliquées de la thèse (mis à part la rédaction du manuscrit, bien évidemment) mais les échanges que nous avons eu étaient très instructifs. Je peux dire que je suis enchantée d’avoir travaillé avec vous tous.

Je tiens aussi à remercier le directeur actuel de l’Institut Charles Violette, Jean-Louis Hilbert, ainsi que le précédent directeur, Pascal Dhulster, pour m’avoir accueilli dans le laboratoire et avoir assuré le suivi de ma formation doctorale.

J’adresse aussi mes remerciements à tous les membres de l’Institut Charles Violette. Merci Corinne pour ton aide quotidienne au laboratoire ainsi que ton humour qui égailait mes journées. Merci à mes collègues du bureau que j’ai côtoyés ces dernières deux années Dahlia, Adrien, Marie, Elsa, Barth, Carlos, Morgane et Xav! Merci également à Barbara, notre experte en analytique, à Matthieu, notre expert en Biomol, et à Cathy pour ton efficacité dans les tâches administratives (et je t’en ai donné quelques unes avec mes déplacements fréquents)! Je remercie aussi Ali, Stéphanie, Alexandre, Eléonore, Rémy, Désiré, Adrian et tous les doctorants pour la bonne ambiance qu’ils mettaient dans le laboratoire. Grâce à mon séjour lillois, j’ai eu aussi la chance de croiser la route de certaines personnes, les potos : Cyril, Max, Angéline, Marjo et Juliette. Chin Chin à tous ces moments sympas que nous avons partagés, même si c’était un peu dur pour moi de suivre votre rythme de fête. Un merci particulier à Cyril pour la relecture du manuscrit et les bons conseils que tu as pu me donner.

Je remercie également du fond du cœur les collègues gembloutois. Vous étiez tous d'une gentillesse et générosité incroyable. Merci Marina, Margue, Cathy, Martine et Danielle d'être là pour tout le monde. En croisant mes doigts pour ne pas oublier des gens sur ma longue liste, je remercie Olivia, Greg, Antho, Adrien, Hannah, Jelena, Hosni, Wenzheng, Boris, Romain, Dingrong, Imen, Diem, Thibault, Andrew, Sam et Tambi. Vous étiez tous prêts à m'aider quand j'en avais besoin. J'adresse un remerciement particulier à Sebi Seb Seb, mon meilleur co-équipier d'extraction d'ARN. C'est toujours agréable de papoter et rigoler avec toi (et bosser bien évidemment) ! Et finalement, merci à mon « International Girl Squad » Sokny, Ghazal et Sofija. Nous venons tous de 4 coins différents du monde, toutefois nous sommes devenues amies comme si nous nous connaissions depuis très longtemps. Nous avons commencé par des échanges scientifiques sur nos projets qui présentaient quelques similitudes, mais nous avons fini par créer des liens forts entre nous et devenir des supports l'une pour l'autre. Sofija, my one and only babygirl, j'avais prévu de te dédier un paragraphe en anglais mais je pense que maintenant tu comprends le français au moins autant que moi ! Quoique je puisse dire, ce ne sera pas assez pour te remercier pour le nombre de fois où tu as été à mes côtés. Nous sommes passées toutes les deux par des hauts et des bas mais nous avons toujours réussi à s'en sortir ensemble avec des frites, des pâtes carbo ou avec des « movie night » accompagnées d'un verre de Languedoc et plein de popcorn !

Il ne faudrait surtout pas oublier de remercier les personnes qui ont semé la graine de la passion pour la biologie en moi. Merci à Mme Lina Yamak, Sylvie Fenianos, Ikbal Kassem et Mona Chammas qui m'ont formé pendant mes études scolaires. Vous êtes tous des modèles pour moi, de part votre implication et votre dévouement à la science et l'enseignement. A mes profs de fac, Mona Tannoury, Hassan Makhoulf, Jean Stephan, Youmna Salame, Dany Azar, Rita Mouawad, Hala Samaha, les plus grandes leçons ne sont pas tirées d'un livre mais des enseignants tels que vous. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté. Je remercie également Eric Record, mon maître de stage de M2, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Je te remercie du fond du cœur pour ta bienveillance et la confiance que tu as mis en moi et qui m'a permis de devenir une chercheuse.

Je dédie mes derniers remerciements à la famille. Maman... Papa... que pourrais-je dire pour vous exprimer ma reconnaissance ? Vous m'avez encouragé depuis le départ à poursuivre mes études jusqu'au bout, même si cela voulait dire être loin de vous pendant des années. Le soutien que vous m'avez apporté avec mes frères Julien et Antoine a été essentiel pour achever cette étape de ma vie. J'espère que mon nouveau diplôme sera à la hauteur de vos attentes et vous rendra encore plus fières de moi. Merci à mes sœurs que maman ne m'a pas donné, Sarah et Rita. Malgré la distance, vous avez toujours été là. J'adresse aussi mes remerciements à ma deuxième famille française. Vous m'avez accueilli parmi vous comme votre fille et vous m'avez fourni plein d'amour qui a compensé en partie l'absence de ma famille. Antoine, mes remerciements pour toi sont infinis. Grâce à ta présence à mes côtés, ton humour et surtout ton aide et tes mots encourageants, j'ai pu et je pourrai tout surmonter.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Remerciements	v
Table des matières	ix
Liste des figures.....	xvi
Liste des tableaux	xxv
Liste des abbréviations	xxvii
Avant-propos	1
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	5
1. Introduction générale.....	7
1.1. Les pathologies végétales	7
1.2. Les impacts économiques.....	9
2. Les solutions chimiques pour la protection des cultures	9
2.1. Généralités	9
2.2. Effets néfastes des fongicides.....	10
2.2.1. Risque de résistance chez les champignons pathogènes.....	10
2.2.2. Altération de la communauté microbienne du sol	10
2.2.3. Bioaccumulation dans divers éléments de l'écosystème	10
2.2.4. Impacts sur la santé chez l'homme.....	11
3. Les solutions biologiques pour la protection des cultures	11
3.1. Généralités	11
3.2. Les médiateurs chimiques	14
3.3. Les substances naturelles.....	14
3.4. Les macroorganismes	15
3.5. Les microorganismes.....	16
4. L'implication de <i>Bacillus</i> en biocontrôle	17
4.1. Le genre <i>Bacillus</i>	17
4.2. Le biofilm, un mode de vie avantageux	17
4.3. Modes d'action contre les pathogènes.....	19

4.3.1. Les composés organiques volatiles	20
4.3.2. Les bactériocines	21
4.3.3. Les NRPs et les PKs	21
4.3.3.1 Les surfactines	25
4.3.3.2 Les fengycines	28
4.3.3.3 Les iturines	29
4.3.4. Les enzymes	30
4.3.5. Promotion de la croissance des plantes.....	30
4.4. Produits de biocontrôle commercialisés à base de <i>Bacillus</i>	31
5. Implication de <i>Trichoderma</i> dans le biocontrôle.....	33
5.1. Le genre <i>Trichoderma</i>	33
5.2. Modes d'action dans le biocontrôle.....	33
5.2.1. Mycoparasitisme.....	33
5.2.2. Antibiose.....	35
5.2.3. Compétition pour les nutriments	35
5.2.4. Induction des défenses de la plante	36
5.2.5. Promotion de la croissance de la plante.....	36
5.3. Produits de biocontrôle commercialisés à base de <i>Trichoderma</i>	38
6. Combinaison de BCAs en biocontrôle	39
6.1. Les avantages.....	39
6.2. Les défis.....	40
6.3. Exemples de combinaison de <i>Bacillus</i> et <i>Trichoderma</i> en biocontrôle	41
6.4. Produits de biocontrôle commercialisés combinant <i>Bacillus</i> et <i>Trichoderma</i>	42
7. Etude de la compatibilité des souches	43
7.1. Les types d'interaction.....	44
7.2. Les interactions bactérie-champignon	45
7.3. Les aspects coopératifs de l'interaction microbienne <i>in vitro</i>	46
7.3.1. Comblement des déficits nutritionnels	46
7.3.1.1 Nutrition en azote des microorganismes.....	47
7.3.1.2 Assimilation de l'azote sous forme de nitrate.....	48

7.3.2. Amélioration de la production.....	50
7.4. Les cocultures comme système d'étude des interactions	50
7.4.1. Les différentes techniques de coculture.....	50
7.4.2. Les défis	54
7.4.3. Les cocultures <i>Bacillus</i> – <i>Trichoderma</i>	54
8. Objectifs	58
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	61
1. Souches.....	63
2. Méthodes d'analyses biologiques.....	65
2.1. Microscopie optique et électronique à balayage.....	65
2.2. Quantification de <i>T. harzianum</i>	66
2.3. Quantification de <i>B. velezensis</i>	67
3. Génération de surnageants de culture.....	67
4. Culture dans le milieu riche.....	68
4.1. Composition du milieu et conditions de culture.....	68
4.2. Optimisation des conditions de culture et d'attachement sur support ..	69
4.2.1. Le pH.....	69
4.2.2. Vitesse d'agitation.....	70
4.2.3. Inoculation séquentielle.....	71
4.3. Effet des lipopeptides de <i>B. velezensis</i> sur <i>T. harzianum</i>	71
4.3.1. Test de confrontation sur boîte avec des mutants de <i>B. velezensis</i>	71
4.3.2. Test de culture de <i>T. harzianum</i> avec supplémentation de lipopeptides dans le milieu	72
4.4. Effet du surnageant de <i>T. harzianum</i> sur l'activité antifongique et antibactérienne de <i>B. velezensis</i>	73
5. Cultures en milieu nitrate	74
5.1. Composition du milieu et conditions de culture.....	74
5.2. Cultures dans le milieu nitrate avec différentes sources d'azote	75
5.3. Etude de la viabilité et l'état métabolique des cellules de <i>B. velezensis</i> par cytométrie en flux.....	76
5.4. Effet de <i>T. harzianum</i> sur la production de lipopeptides par <i>B. velezensis</i>	77

5.4.1	Effet du surnageant de <i>T. harzianum</i>	77
5.4.2	Effet de l'interaction physique <i>T. harzianum</i> – <i>B. velezensis</i>	78
5.5.	Effet de la coculture sur l'activité antifongique et antibactérienne de <i>T. harzianum</i> et <i>B. velezensis</i>	78
6.	Méthodes d'analyses chimiques.....	78
6.1.	Quantification du glucose par HPLC.....	78
6.2.	Détection et quantification des lipopeptides par UPLC-MS.....	79
6.3.	Analyse des composants du surnageant par MALDI-TOF.....	80
6.4.	Analyse des composants du surnageant par HPLC-ESI-Q/TOF.....	80
6.5.	Analyse des acides aminés par HPLC.....	81
7.	Quantification des biomasses des différentes souches en coculture par qPCR.....	83
7.1.	Relation matière fraîche – matière sèche.....	83
7.2.	Extraction de l'ADN.....	85
7.2.1.	Extraction avec le kit GeneJet genomic DNA purification.....	85
7.2.2.	Extraction avec le kit Fungi/Yeast genomic DNA isolation.....	85
7.2.3.	Quantification de l'ADN.....	86
7.2.4.	Vérification de la qualité de l'ADN.....	86
7.3.	Relation matière fraîche – quantité d'ADN.....	86
7.4.	Design des amorces pour <i>T. harzianum</i>	86
7.5.	Vérification de la spécificité des amorces vis-à-vis de chaque souche.....	88
7.6.	Quantification des biomasses par qPCR.....	90
8.	Etude de l'expression des gènes de synthétases de lipopeptides par RT-qPCR.....	93
8.1.	Extraction d'ARN.....	93
8.2.	Quantification de l'ARN et vérification de sa qualité.....	94
8.3.	Expression des gènes par RT-qPCR.....	95
9.	Méthodes d'analyses bioinformatiques.....	97
9.1.	Analyse des voies métaboliques par KEGG.....	97
9.2.	Recherche des gènes d'intérêts par BLAST.....	97
10.	Analyses statistiques.....	97

Chapitre 3 : Résultats.....99

1. Croissance de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>T. harzianum</i> IHEM5437 dans le milieu riche TY.....	101
1.1. Optimisation de l'attachement sur le support.....	102
1.1.1. Optimisation de la vitesse d'agitation.....	102
1.1.2. Optimisation du pH.....	103
1.2. Coculture de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>T. harzianum</i> IHEM5437.....	103
2. Quantification de la proportion relative des biomasses dans un biofilm mixte.	107
3. Compatibilité des souches et effet de leur interaction sur leur activité antimicrobienne.....	107
3.1. Effet de <i>B. velezensis</i> sur la croissance de <i>T. harzianum</i>	107
3.2. Effet du surnageant de <i>T. harzianum</i> sur la croissance et l'activité de <i>B. velezensis</i>	109
3.3. Effet de <i>T. harzianum</i> sur la production de lipopeptides.....	111
4. Croissance de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>T. harzianum</i> IHEM5437 dans le milieu nitrate MN.....	113
4.1. Choix de la source d'azote.....	113
4.2. Monoculture de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>T. harzianum</i> IHEM5437 dans le MN.....	114
4.3. Coculture de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>T. harzianum</i> IHEM5437 dans le MN.....	117
4.4. Suivi de la consommation du glucose dans les monocultures et cocultures.....	118
5. Compatibilité des souches dans le milieu nitrate.....	120
6. Validation du modèle de la coculture.....	121
6.1. Variation de la source d'azote.....	122
6.2. Validation du modèle sur différentes souches de <i>Bacillus</i> et <i>Trichoderma</i>	124
7. Effet de <i>T. harzianum</i> sur la croissance de <i>B. velezensis</i> GA1 dans le milieu nitrate.....	126
7.1. Croissance de <i>B. velezensis</i> avec les composantes de la monoculture de <i>T. harzianum</i>	126
7.2. Analyse de la composition du surnageant.....	128

7.2.1. Identification des peptides	128
7.2.2. Identification des acides aminés	130
8. Effet de la coculture sur la production de métabolites secondaires	132
8.1. Echange de métabolites entre <i>T. harzianum</i> et <i>B. velezensis</i>	132
8.2. Les métabolites produits par <i>T. harzianum</i>	133
8.3. Effet de <i>T. harzianum</i> sur la production de lipopeptides	134
Chapitre 4 : Discussion.....	141
1. Quantification des microorganismes dans un biofilm mixte en coculture par qPCR.....	143
2. Le pH et la vitesse d'agitation, paramètres clés influençant l'attachement des microorganismes sur le support	144
3. Développement de stratégies de coculture.....	146
3.1. Milieux de culture sélectionnés en fonction des sources de nutriments	147
3.2. Croissance en monocultures favorisée dans le milieu TY par rapport au MN	147
3.3. Croissance en cocultures favorisée dans le MN par rapport au TY	149
3.3.1. Amensalisme de <i>B. velezensis</i> vis-à-vis de <i>T. harzianum</i> en coculture en milieu riche TY	150
3.3.2. L'inoculation séquentielle dans le milieu TY, une stratégie permettant d'amorcer l'amensalisme entre <i>B. velezensis</i> et <i>T. harzianum</i> .	152
3.3.3. La mise en place d'une dépendance nutritionnelle, une stratégie permettant de lever la compétition entre <i>B. velezensis</i> et <i>T. harzianum</i>	153
3.3.4. Utilisation de la dépendance nutritionnelle pour permettre une coopération entre <i>B. velezensis</i> et <i>T. harzianum</i> : une approche validée....	156
4. La production de lipopeptides par <i>B. velezensis</i> GA1 impactée par le type d'interaction avec <i>T. harzianum</i>	157
4.1. Pas d'effet sur la production de lipopeptides en présence d'un amensalisme.....	157
4.2. Répression de la production de lipopeptides par <i>B. velezensis</i> en coopération avec <i>T. harzianum</i>	158
Chapitre 5 : Conclusions et perspectives	164
1. Conclusions	166
2. Perspectives	169

2.1.	Optimisation des conditions expérimentales	169
2.2.	Analyses approfondies du dialogue moléculaire	169
2.2.1.	Criblage de molécules d'intérêt.....	169
2.2.2.	Décryptage de l'interaction bactérie – champignon dans le milieu nitrate.....	170
2.3.	Développement d'applications agricoles.....	170
2.3.1.	Etude de l'interaction <i>in planta</i>	170
2.3.2.	Développement d'un nouveau produit de biocontrôle.....	171
Références	173

Liste des figures

Figure 1 : Aperçu du marché du biocontrôle avec (A) la part du marché du biocontrôle dans les ventes de produit pour la protection des plantes en France en 2018 avec le pourcentage des différentes catégories de BCA (d'après l'IBAM), et (B) l'évolution du marché de biocontrôle entre l'année 2011 et 2018 (d'après Robin et Marchand, 2019)..... 12

Figure 2 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm comprenant l'adhésion des cellules sur le support, le développement des cellules et la production de polymères exocellulaires, la maturation du biofilm et la dispersion des cellules (d'après Kolter, 2010)..... 18

Figure 3 : Les différents modes d'action employés par *Bacillus* et *Trichoderma* dans le biocontrôle..... 20

Figure 4 : Présentation des principaux domaines NRPS impliqués dans le mécanisme de la synthèse non-ribosomique : les domaines d'adénylation (A) responsable de la reconnaissance du monomère et de son activation en amino-acyl adénylate, de thiolation (T) responsable de la fixation de l' amino-acyl adénylate au niveau du groupe sulfhydryle du bras phosphopantéthénique, de condensation (C) responsable de la catalyse de la formation d'une liaison peptidique entre les monomères reconnus par des modules adjacents et finalement le domaine de thioestérase (Te) impliqué dans la libération du NRP du domaine de thiolation final par hydrolyse du lien thioester (d'après Vassaux, 2019 [114])..... 23

Figure 5 : (A) Opéron *srfA* formé de 4 gènes : *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* et *srfAD* codant pour les synthétases nonribosomiques responsables de l'incorporation des 7 monomères composants la surfactine, (B) Structure cyclisée de la surfactine présentant une chaîne d'acide gras linéaire de 16 atomes de carbone (la taille de la chaîne d'acide gras pouvant varier de 12 à 17 atomes de carbone) (d'après Peypoux *et al.*, 1999)..... 25

Figure 6 : Mécanisme d'induction de la résistance chez les plantes par la surfactine : l'interaction de la surfactine avec la membrane cytoplasmique des cellules végétales induit les mécanismes de défense locale ainsi que la production de ROS. Ces inductions provoquent la production d'acides jasmonique et salicylique, activant le régulateur de transcription NPR1. La perception ultérieure du pathogène stimulera plus rapidement l'expression des gènes liés aux mécanismes de défense de la plante (d'après Ongena et Jacques, 2008). 27

Figure 7 : (A) Opéron *fen* formé de 5 gènes : *fenA*, *fenB*, *fenC*, *fenD*, *fenE* codant pour les synthétases nonribosomiques responsables de l'incorporation des 10 monomères composants la fengycine, (B) Structure cyclisée de la fengycine présentant une chaîne d'acide gras linéaire de 14 atomes de carbone (la taille de la chaîne d'acide gras pouvant varier de 14 à 18 atomes de carbone) (d'après Ongena *et al.* 2005)..... 28

Figure 8 : (A) Opéron *itu* formé de 4 gènes : *ituA*, *ituB*, *ituC*, *ituD* codant pour les synthétases nonribosomiques responsables de l'incorporation des 7 monomères composants l'iturine, (B) Structure cyclisée de l'iturine présentant une chaîne d'acide gras linéaire de 16 atomes de carbone (la taille de la chaîne d'acide gras pouvant varier de 14 à 17 atomes de carbone) (d'après Tsuge *et al.*, 2005)29

Figure 9 : Les différentes étapes de mycoparasitisme de *Trichoderma* comprenant la perception du pathogène et son rapprochement par chimiotropisme, suivi par la reconnaissance de ce dernier et l'attachement par enroulement autour de ses hyphes, la production d'enzymes lytiques pour dégrader les parois du pathogène et la formation d'appressoria pour y pénétrer34

Figure 10 : Les 6 différentes interactions possibles entre les microorganismes (compétition : -/-, prédation : +/-, amensalisme : -/0, commensalisme : +/-, mutualisme : +/+, pas d'interaction : 0/0)44

Figure 11 : Utilisation du nitrate extracellulaire par voie dissimilatoire (le nitrate est réduit en nitrite puis en ammonium sécrété) et assimilatoire (le nitrate est réduit en nitrite puis en ammonium qui servira à la synthèse du glutamate). L'azote présent sur le glutamate servira ensuite à la synthèse d'autres molécules azotées tels que d'autres acides aminés et les acides nucléiques qui pourront éventuellement être excrétés dans le milieu extracellulaire.48

Figure 12 : Les différentes morphologies d'interaction distinguées sur boîte (zone d'inhibition, ligne d'inhibition, contact d'inhibition et surcroissance) (d'après Bertrand *et al.*, 2014).....51

Figure 13 : Système de microfluidique permettant l'étude de l'interaction entre les champignons filamenteux et les bactéries par la croissance du mycélium dans des canaux parallèles amenant à la bactérie (d'après Stanley *et al.*, 2014)51

Figure 14 : (A) Différents systèmes pour étudier l'interaction microbienne avec séparation des microorganismes en (A_I) microfluidiques (A_I) par des microcanaux, (A_{II}) une membrane, ou (A_{III}) des gouttelettes correspondantes à une émulsion, (B) en microplaque avec des inserts contenant une membrane, et en bioréacteurs par des membranes variés : (C) en polycarbonate permettant la diffusion des molécules volatiles et (D) membrane de microfiltration. Les flèches indiquent le sens d'échange de molécules (figures adaptées respectivement de Zheng *et al.*, (2012), Heyse *et al.*, (2019), Salerno *et al.* (2018), Taniguchi et Tanaka (2004)).53

Figure 15 : Schématisation de la cellule de Burkholderia utilisatrice pour le comptage des spores de *T. harzianum* (les spores dans les cadrans 1, 2, 3, 4 et 5 sont comptées.) .66

Figure 16 : Support métallique composé de deux feuilles en métal structuré attachées avec un collier de serrage utilisé pour la culture en biofilm dans des bioréacteurs69

Figure 17 : Schématisation du bioréacteur à biofilm à film tombant, constitué d'un bioréacteur conventionnel de 2 L relié à une colonne renfermant 5 disques de support

métallique superposés. Le milieu de culture circule du bioréacteur, où se trouvent les sondes permettant le contrôle du pH et de la température, vers la colonne, puis de la colonne vers le bioréacteur 70

Figure 18 : Détermination de l'effet antagoniste des différents mutants de *B. velezensis* GA1 vis-à-vis de *T. harzianum* IHEM5437 sur boîte de Pétri contenant le milieu TY solide. Une goutte contenant les cellules bactériennes est placée à 1 cm de la colonie de champignon. La zone d'inhibition Zi entre les deux colonies de microorganismes est mesurée après 48 h d'incubation. 72

Figure 19 : Détermination de l'activité antifongique du surnageant de *B. velezensis* GA1 par la méthode des puits en ajoutant les variants de ce surnageants dans les puits et en analysant la zone d'inhibition autour des puits 73

Figure 20 : (A) Corrélation entre la matière fraîche et la matière sèche de *B. velezensis* et *T. harzianum* issus de monocultures dans le milieu TY, (B) Corrélation entre la matière fraîche de ces mêmes microorganismes et la concentration d'ADN extrait avec le kit Fungi/Yeast genomic DNA isolation et dosé avec le Qubit 3.0... 84

Figure 21 : (A) Courbe de fusion pour les amplifications par qPCR réalisées sur les génomes de *B. velezensis* GA1 (gris) et *T. harzianum* IHEM5437 (rouge) avec les amorces de la gyrase de *B. velezensis* S499 (*QGyr*), (B) Courbe standard des Ct obtenus pour différentes concentrations d'ADN de *B. velezensis* GA1, diluées de 5 en 5 89

Figure 22 : (A) Courbe de fusion pour les amplifications par qPCR réalisées sur les génomes de *T. harzianum* IHEM5437 (rouge) et de *B. velezensis* GA1 (gris) avec les amorces des régions ITS de *T. harzianum* IHEM5437, (B) Courbe standard des Ct obtenus pour différentes concentrations d'ADN de *T. harzianum*, diluées de 5 en 5 90

Figure 23 : Concentration d'ADN (en ng par μ L) de *B. velezensis* calculée dans le mélange de biomasse (en mg) de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 .. 92

Figure 24 : Vérification sur gel de la qualité de l'ARN extrait des cellules de *B. velezensis* GA1 issues d'une monoculture de 24 h dans le milieu TY après extraction avec plusieurs kits utilisant différentes méthodes de lyse 95

Figure 25 : Observations à l'œil nu et en microscopie optique (avec les grossissements x 400 et x 1000) de l'attachement des biomasses respectives de (A) *T. harzianum* IHEM5437 et (B) *B. velezensis* GA1 sur le support métallique en monoculture dans le milieu TY après 48 h d'incubation à 30 °C..... 101

Figure 26 : Suivi de la matière sèche (en mg) des biofilms de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 attachés sur le support métallique en monoculture dans le milieu TY sous différentes vitesses d'agitation (80, 100 et 120 rpm) après 24, 48, 72 et 96 h d'incubation à 30 °C 102

Figure 27 : Matière sèche (en g) du biofilm de *B. velezensis* GA1 attaché sur les 5 disques de support métallique implementés dans un bioréacteur à biofilm à film tombant avec et sans régulation de pH à 6,5 dans le milieu TY après 48 h de culture à 30 °C avec une agitation de 400 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$103

Figure 28 : Observations à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement x 1000 des spores non germinées de *T. harzianum* IHEM5437 (flèche jaune) dans l'inoculum et dans la coculture avec *B. velezensis* GA1 (flèche rouge) dans le milieu TY après 24 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm.....104

Figure 29 : (A) Quantification de la croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) dans la phase planctonique des monocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 ainsi que dans les cocultures avec inoculation séquentielle (avec un délai de 24 ou 48 h) en présence du support métallique dans le milieu TY après 24, 48 et 72 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm, et (B) quantification de la croissance des biofilms en termes de masse sèche sur le support métallique dans ces mêmes conditions de culture. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$).105

Figure 30 : Observations à l'œil nu et à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement x 400 de l'attachement sur le support métallique des biofilms mixtes de champignon (flèche jaune) et de bactérie (flèche rouge) dans les cocultures avec inoculation séquentielle (A) *T. harzianum* 24 h – *B. velezensis* et (B) *T. harzianum* 48 h – *B. velezensis* dans le milieu TY après 48 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm.....106

Figure 31 : (A) Tests de confrontation sur boîte de milieu TY entre *T. harzianum*, *B. velezensis* GA1 et ses différents mutants simples et doubles pour les gènes codant pour les synthétases des 3 familles de lipopeptides, (A_I) aspect de croissance des microorganismes sur boîte de Pétri contenant le milieu TY solide, la présence des barres roses, bleus et jaunes correspond respectivement à la capacité du mutant à produire l'iturine, la fengycine et la surfactine, (A_{II}) La zone d'inhibition (cm) observée entre la colonie de *T. harzianum* IHEM5437 et les mutants de *B. velezensis* GA1. (B) Matière sèche (en mg) de *T. harzianum* obtenue dans une monoculture dans le milieu TY en présence de 12 g.L⁻¹ d'iturine, de fengycine ou de surfactine après 48 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey (significativement différent, $\alpha < 0,05$))......108

Figure 32 : Croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) après 24 h d'incubation à 30 °C dans le milieu TY en absence ou en présence de différentes concentrations de

surnageant (5 et 10 %) issu d'une monoculture de *T. harzianum* âgée de 48 h dans le milieu TY. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative. 109

Figure 33 : Détermination de l'inhibition de la croissance de plusieurs phytopathogènes (*A. tumefaciens*, *X. campestris*, *C. michiganensis*, *R. fascians*, *B. cinerea*, *R. mucilaginosa*) par la méthode des puits, en présence de 100 µL de surnageants de *B. velezensis* GA1 issus de monocultures dans le milieu TY, supplémentées ou pas avec différentes concentrations (5 et 10 %) d'un surnageant issu d'une monoculture de *T. harzianum* dans le milieu TY âgée de 48 h. L'expérience est effectuée avec 3 répétitions biologiques. 110

Figure 34 : (A) Concentrations de lipopeptides déterminées par UPLC (en g par cellule) produits en monoculture de *B. velezensis* GA1 dans le milieu TY et en coculture avec inoculation simultanée de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu TY. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$. (B) Spectre UV généré par UPLC des lipopeptides produits en monoculture de *B. velezensis* et en coculture avec inoculation séquentielle de *T. harzianum* IHEM5437 24 h - *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 48 h - *B. velezensis* GA1 dans le milieu TY 112

Figure 35 : Réduction du nitrate par voie assimilatoire chez *T. reesei* QM6a et *B. velezensis* FZB42 en nitrite par la nitrate réductase NR et NasAB respectivement, puis en ammonium par la nitrite réductase Nit6 chez *Trichoderma*. Le gène codant pour une nitrite réductase (NirA) dans *Bacillus* n'est pas présent chez *B. velezensis* (d'après KEGG)..... 113

Figure 36 : (A) Matière sèche de *T. harzianum* IHEM5437(en mg) en monocultures et cocultures avec *B. velezensis* en conditions planctoniques et sur support dans le MN après 6 jours d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$), (B) Cinétique de croissance de *T. harzianum* établie en fonction de la matière sèche (en mg) formée en monoculture planctonique dans le MN pendant 6 jours d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm..... 115

Figure 37 : Suivi de la concentration de *B. velezensis* GA1 par cytométrie en flux dans la phase planctonique en monoculture et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 pendant 6 jours de culture dans le MN en conditions (A) planctonique et (B) immobilisée. Les graphiques montrent la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$). 116

Figure 38 : Observation par microscopie électronique à balayage des cocultures de *B. velezensis* GA1 (flèche rouge) et *T. harzianum* IHEM5437 (flèche jaune) âgées de 6 jours dans le MN en (A) conditions planctonique (avec un grossissement x 5500 pour l'image de gauche et x 4500 pour l'image de droite) et (B) sur support (avec un grossissement x 3300 pour l'image de gauche et x 4000 pour l'image de droite) ..118

Figure 39 : Suivi de la consommation de glucose (en g par L) en monocultures et en cocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 en conditions planctonique et immobilisée sur support dans le MN119

Figure 40 : Effet du surnageant de la coculture de *B. velezensis* et *T. harzianum* dans le MN sur la croissance de *T. harzianum* IHEM5437 déterminé par la méthode des puits.....120

Figure 41 : Détermination de l'activité métabolique des cellules de *B. velezensis* GA1 par cytométrie en flux avec le RSG en monoculture en condition (A) planctonique et (C) immobilisée sur support et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 en condition (B) planctonique et (D) immobilisée sur support, à 24 h, 72 h, et 144 h de culture dans le MN. Les résultats sont exprimés en termes de side scatter (SSC), forward scatter (FSC) et de fluorescence verte (FL1) avec un dénombrement de 40000 cellules. Toutes les expérimentations ont été menées en triplicat. Les couleurs rouge et bleu correspondent respectivement à une forte et une faible population.....121

Figure 42 : Croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) en monoculture et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN, le MN supplémenté avec 10 mM de sulfate d'ammonium, le MN sans nitrate MN supplémenté avec 35 mM de sulfate d'ammonium, le MN où le nitrate est substitué par le nitrite et le MN supplémenté avec 0,1 % de casaminoacides après 48 h d'incubation pour les monocultures et 144 h d'incubation pour les cocultures à 30 °C. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$)122

Figure 43 : Suivi de la croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) en microplaque pendant 48 h, en monoculture dans le MN supplémenté séparément avec les 20 acides aminés avec une concentration finale de 1 mM. Le graphique montre la moyenne et les écart-types de trois répétitions biologiques.....123

Figure 44 : (A) Croissance des bactéries *B. velezensis* GA1, *B. velezensis* FZB42, *B. velezensis* S499 et *B. licheniformis* ATCC14580 (DO_{600nm} mesurée après 48 h pour les monocultures et 144 h pour les cocultures) et (B) des champignons *T. harzianum* IHEM5437, *Trichoderma* sp. MUCL58094 et *T. atrobrunneum* MUCL58095 (matière sèche en mg mesurée après 144 h d'incubation) en monoculture et en coculture dans le MN (I) et $MN_{nitrite}$ (II) incubées à 30 °C avec une agitation de 100 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques.

Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$). 125

Figure 45 : (A) Croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) en monoculture dans le MN en présence du surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 pris chaque 24 h d'une monoculture de ce champignon, et (B) en présence des différentes fractions du surnageant pris à 144 h de culture (Fraction A, B, C, D et E renfermant respectivement les molécules de masse moléculaires supérieures à 50 kDa, entre 30 et 50 kDa, 10 et 30 kDa, 3 et 10 kDa et inférieures à 3 kDa) 127

Figure 46 : Chromatogrammes MALDI-TOF de la fraction du surnageant d'une culture de 144 h de *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu MN renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa établi en mode linéaire et mode réflecton 128

Figure 47 : Chromatogramme HPLC-ESI-Q/TOF de la fraction du surnageant d'une culture de 144 h de *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu MN renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa et de cette même fraction concentrée 15 fois 129

Figure 48 : Spectre de masse des différents pics du chromatogramme de l'HPLC-ESI-Q/TOF correspondant à la fraction du surnageant d'une culture de 144 h de *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu MN renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa 130

Figure 49 : Concentration d'azote (en mg par litre) dans les surnageants de monoculture de *T. harzianum* prélevés au jour 3, 4, 5 et 6 de culture dans le MN à 30°C (A) par le kit HACH qui permet de doser la concentration d'azote total et (B) par la méthode Kjeldahl qui permet de doser les formes oxydables de l'azote. Ces graphiques représentent les résultats obtenus avec 3 répétitions biologiques. 131

Figure 50 : Détermination de l'inhibition de la croissance de plusieurs phytopathogènes (*A. tumefaciens*, *X. campestris*, *C. michiganensis* et *F. oxysporum*) par la méthode des puits, en présence de 100 μ L de surnageant prélevé d'une monoculture de *T. harzianum* IHEM5437 de 144 h dans le MN ou d'une coculture avec *B. velezensis* GA1 dans le MN après 144 h d'incubation. L'expérience a été effectuée avec 3 répétitions biologiques 133

Figure 51 : Quantification par UPLC des lipopeptides (en g par cellule) produits par *B. velezensis* GA1 en monoculture planctonique de 48 h dans le MN supplémenté soit avec 10 mM de sulfate d'ammonium, soit avec 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 provenant d'une monoculture de 144 h, et des lipopeptides produits après 144 h de coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 en MN. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$ 134

Figure 52 : (A) Suivi du pH des monocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le MM ainsi que de leur coculture dans ce milieu tamponné ou non avec du MOPS chaque 24 h et pendant 144 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm, (B) Suivi par UPLC de la concentration des lipopeptides (suspendus dans une solution de concentration initiale de 0,5 g.L⁻¹) dans un mélange avec du surnageant de *T. harzianum* issu d'une culture de 144 h dans un rapport de 1 : 1 pendant 24 h. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions techniques.....135

Figure 53 : Cinétique de croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) (A) en monoculture dans le milieu TY et dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 issu d'une culture de 144 h sur ce même milieu MN et (B) en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN, les étoiles rouges correspondent aux heures de prélèvement pour l'analyse par RT-qPCR. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques.136

Figure 54 : (A) Niveau d'expression (RQ qui correspond à la valeur 2^{-ΔΔCt}) des gènes codants pour les synthétases d'iturine, de fengycine et de surfactine chez *B. velezensis* GA1 en monoculture dans le milieu TY et dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 issu d'une culture de 144 h et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN, déterminé par RT-qPCR. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, α < 0,05), (B) Quantification (en g par cellule) par UPLC des lipopeptides produits dans ces même conditions. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », P<0,05 ; « ** », P<0,01 ; « *** », P<0,001 ; « **** », P<0,0001.....138

Figure 55 : Récapitulatif des modalités d'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans les différentes stratégies de coculture150

Figure 56 : Bilan massique de *T. harzianum* IHEM5437 et *B. velezensis* GA1 ainsi que les concentrations d'azote avant et après croissance de ces microorganismes. Les valeurs dosées sont signalée par « * » et les valeurs calculées par « ** ». Pour un apport expérimental de 1,12 g.L⁻¹ (apport théorique de 1,29 g.L⁻¹) dosé par le kit HACH, une matière sèche de 0,46 g de *T. harzianum* est pesée après 144 h d'incubation à 30 °C et une concentration résiduelle d'azote de 0,77 g.L⁻¹ est dosée (par le kit HACH). Ceci implique une concentration de 0,35 g.L⁻¹ d'azote consommé par le champignon. La forme dominante d'azote trouvé dans le surnageant de *Trichoderma* est le nitrate (0,89 g.L⁻¹ d'après le dosage par un kit HACH pour les nitrates). Les formes assimilables par *Bacillus* constituent 13 mg.L⁻¹ (dosées par la méthode Kjeldahl) et permettent, après une dilution de 10 fois, la formation de 0,65 g.L⁻¹ de matière sèche de *B. velezensis* (dont 78 mg correspond à l'azote).....154

Figure 57 : Le mécanisme d'interaction entre *B. velezensis* et *Trichoderma* en coculture dans le MN ou en monoculture de *B. velezensis* en présence du surnageant de *Trichoderma* dans le MN affectant la production de lipopeptides par la bactérie 159

Figure 58 : Résumé des hypothèses expliquant les interactions potentielles entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHÉM5437 en présence d'une dépendance nutritionnelle vis-à-vis de l'azote. En terme de croissance, l'incapacité de *B. velezensis* à assimiler le nitrate est comblée par la production par *T. harzianum* (A_I) d'autres composés azotés assimilables ou (A_{II}) des molécules signal induisant une nouvelle voie d'assimilation du nitrate chez *B. velezensis*. (B) Quant à la production de lipopeptides, un dialogue moléculaire potentiel entre les deux microorganismes (émission d'un signal par *Bacillus*, perception par *Trichoderma* et réponse par l'émission d'un second messenger, inhibition de la synthèse des LPs synthetases à la perception de ce second messenger par *Bacillus*) engendre l'inhibition de la production des lipopeptides antifongiques par la bactérie. 168

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents pathogènes causant des phytopathologies, leur mode d'action et les impacts sur la plante.....	8
Tableau 2 : Les produits de biocontrôle à base de <i>Bacillus</i> sur les marchés français et belge : la souche de <i>Bacillus</i> qu'ils renferment ainsi que le pathogène contre lequel chaque produit est homologué (d'après la direction générale de l'alimentation, service des actions sanitaires en production primaire en France et le site web officiel du service public fédéral de la santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement en Belgique).....	32
Tableau 3 : Les produits de biocontrôle à base de <i>Trichoderma</i> sur les marchés français et belge, la souche de <i>Trichoderma</i> qu'ils renferment ainsi que le pathogène contre lequel chaque produit est homologué (d'après la direction générale de l'alimentation, service des actions sanitaires en production primaire en France et le site web officiel du service public fédéral de la santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement en Belgique).....	38
Tableau 4 : Liste des produits de biocontrôle à base de <i>Bacillus</i> et <i>Trichoderma</i> sur le marché mondial, des souches qu'ils renferment, et du fournisseur associé	42
Tableau 5 : Les différentes souches utilisées, leurs caractéristiques et leurs origines	64
Tableau 6 : Composition du milieu nitrate MN	74
Tableau 7 : Les paramètres d'élution des hydrolysats d'acides aminés par HPLC	83
Tableau 8 : Paramètres d'amplification PCR du gène ITS : (A) les amorces utilisées, (B) la composition du mix de réaction, (C) les cycles PCR	87
Tableau 9 : Paramètres de la qPCR pour la quantification de l'ADN génomique : (A) les amorces de la gyrase utilisées, (B) la composition du mix de réaction, (C) les cycles qPCR	88
Tableau 10 : Concentration d'ADN (ng par µl) extrait d'un mélange de différentes biomasses (en mg) de <i>B. velezensis</i> GA1 et <i>T. harzianum</i> IHEM5437	91
Tableau 11 : Concentration d'ARN (en ng par µl) extrait des cellules de <i>B. velezensis</i> GA1 en monoculture dans le milieu TY et dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de <i>T. harzianum</i> IHEM5437 issu d'une culture de 144 h et en coculture avec <i>T. harzianum</i> dans le MN	94
Tableau 12 : Paramètres de la RT-qPCR pour quantification de l'ARN : (A) les amorces homologues aux synthétases de lipopeptides utilisées, (B) la composition du mix de réaction, (C) les cycles RT-qPCR	96
Tableau 13 : Volume de surnageant de <i>T. harzianum</i> IHEM5437 minimal requis pour les dosages HPLC afin d'atteindre le seuil de détection des acides aminés....	132

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans les différentes conditions de culture de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 147

Liste des abbréviations

BCA : agent de biocontrôle

IBAM : International Biocontrol Manufacturers Association

PGPR : Rhizobactérie promotrice de la croissance des plantes

RSA : résistance systémique acquise

RSI : résistance systémique induite

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Milieux :

MN : milieu nitrate

TY : milieu tryptone – extrait de levure

PDA : milieu agare dextrose – pomme de terre

LB : milieu lysogeny broth

Techniques :

UPLC : Chromatographie liquide ultra-performance

HPLC : Chromatographie liquide haute-performance

MALDI : désorption-ionisation laser assistée par matrice

TOF : analyseur en masse à temps de vol

Q/TOF : analyseur quadripôle couplé à un temps de vol

ESI : ionisation par electrospray

MS : spectrométrie de masse

PCR : réaction en chaîne par polymérase

qPCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative

RT-qPCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative par transcriptase réverse

Acides aminés :

Glu : acide glutamique

Gln : glutamine

Asp : acide aspartique

Asn ; asparagine

Leu : leucine

Val : valine

Pro : proline

Orn : ornithine

Tyr : tyrosine

Thr : thréonine

Ala : alanine

Ser : sérine

Paramètres et unités :

p/v : poids par volume

v/v : volume par volume

ppm : partie par million

μM : micromolaire

mM millimolaire

M : molaire

sec : seconde

min : minute

h : heure

$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius

V : volt

kV : kilovolt

μm : micromètre

mm : millimètre

mm^2 : millimètre au carré

cm^2 : centimètre au carré

μL : microlitre

mL : millilitre

L : litre

ng : nanogramme

mg : milligramme

g : gramme

rpm : rotation par minute

Da : dalton

kDa : kilodalton

x g : force gravitationnelle

kb : kilobase

$\text{DO}_{600\text{nm}}$: densité optique pour une absorbance de 600 nm

Ms : matière sèche

Mf : matière fraîche

m/z : rapport masse sur charge

M+H : masse moléculaire de la molécule additionnée de la masse moléculaire d'un hydrogène

Fw : amorce sens

Rv : amorce anti-sens

Chimie :

CO_2 : dioxyde de carbone

N_2 : azote gazeux

NO_2^- : nitrite

NO_3^- : nitrate
 NH_4^+ : ammonium
NaOH : hydroxyde de sodium
KOH : hydroxyde de potassium
 H_3BO_3 : acide borique
 H_2O : eau
 ZnSO_4 : sulfate de zinc
 MnCl_2 : chlorure de manganèse
 FeSO_4 : sulfate de fer
 CoCl_2 : chlorure de cobalt
 CuSO_4 : sulfate de cuivre
 Na_2MoO_4 : Molybdate de sodium
 MgSO_4 : sulfate de magnésium
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: sulfate d'ammonium
 NaNO_3 : nitrate de sodium
KCL : chlorure de potassium
 KH_2PO_4 : phosphate de monopotassium

Molécules :

EPS : substances polymériques extracellulaires
COV : composés organiques volatiles
ROS : espèces réactives de l'oxygène
NRPS : peptide nonribosomique synthétase
PKS : polykétide synthase
NRP : peptide nonribosomique
PK : polykétide
LP : lipopeptide
LOX : lipoxygénase
PAL : phénylalanine ammonium lyase
AJ : acide jasmonique
AS : acide salicylique
ET : Ethylène
6PP : 6-pentyl-2H-pyran-2-one
Co-A : coenzyme A
AMP : Adénosine monophosphate
ATP : Adénosine triphosphate
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
DAPG : 2,4-diacétylphloroglucinol
CA : cellulose
PTFE : polytétrafluoroéthylène

PI : iodure de propidium

RSG : redox sensor green

TFA : acide trifluoroacétique

FA : acide formique

MOPS : acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

Avant-propos

Les pertes de rendement dans les récoltes ont de tout temps constitué un problème crucial pour le monde agricole et économique. Annuellement, une perte pouvant aller jusqu'à 40 % de la moisson est estimée à cause des pathogènes et des ravageurs des végétaux. Depuis des siècles, les scientifiques multiplient leurs efforts pour trouver les solutions les plus efficaces pour lutter contre ces menaces. Les produits chimiques, appelés pesticides, furent dans un premier temps les principaux outils pour éradiquer le danger que présentait les organismes nuisibles aux plantes. Des effets néfastes des pesticides sur l'environnement, les animaux et surtout l'être humain furent rapidement constatés. Une alternative plus écologique qui vise à utiliser des produits d'origine biologique a donc été développée afin de substituer progressivement les produits chimiques, ils se dénomment agents de biocontrôle. Dans ce moyen de lutte, des molécules naturelles ou des macro/microorganismes sont utilisés. Les molécules peuvent être d'origine végétale (ex : les huiles essentielles), animale (ex : les phéromones) ou microbienne (ex : les substances antimicrobiennes). En outre, des macro et microorganismes, notamment les champignons et les bactéries, peuvent être exploités pour protéger les plantes. Leur action peut être directe en inhibant la croissance des pathogènes ou indirecte en stimulant la croissance de la plante ainsi que ses mécanismes de défense. La combinaison de plusieurs agents de biocontrôle constitue une piste intéressante pour le développement de biopesticides avec une plus grande efficacité.

Depuis deux décennies, le marché du biocontrôle est en croissance exponentielle. En d'autres termes, de nouveaux biopesticides sont mis sur le marché en continu, et l'intérêt des agriculteurs pour ces produits est en augmentation. Ils constituent actuellement 15 % du marché des produits de protection des plantes, avec un objectif fixé au double en 2030. En conséquence, la mise sur le marché de nouveaux produits de biocontrôle constitue un enjeu d'actualité. Toutefois, des étapes antérieures à l'homologation de ces produits sont requises. Dans le cas où le produit renferme plusieurs microorganismes, des études *in vitro* sont essentielles pour générer des données sur les caractéristiques des espèces utilisées. La combinaison de plusieurs espèces différentes requiert davantage d'expériences pour étudier leur comportement, leur compatibilité et leur efficacité combinée.

Ces travaux de thèse viennent s'insérer dans ce contexte. L'objectif du présent travail est de décrypter la compatibilité et les interactions entre deux agents de biocontrôle appartenant aux genres *Bacillus* et *Trichoderma*. L'étude se focalisera notamment sur les lipopeptides, métabolites secondaires antifongiques, produits par *Bacillus*. Ces métabolites, assemblés par des complexes enzymatiques (voie non-ribosomique), sont composés d'un cycle peptidique hydrophile auquel une chaîne lipidique hydrophobe vient s'attacher. Cette propriété amphiphile confère aux lipopeptides des activités surfactantes et antimicrobiennes, ce qui les rend prometteurs dans le cadre de la lutte biologique contre les phytopathogènes.

Ce projet de thèse a été mené en cotutelle entre l'Université de Lille et l'Université de Liège Gembloux-AgroBiotech, dans le cadre d'une collaboration entre ces deux

structures sous la forme d'un Laboratoire International Associé. En 2018, cette collaboration s'est concrétisée par la mise en place d'une Unité Mixte de Recherche transfrontalière (UMRt) intitulée UMRt INRAE BioEcoAgro. Celle-ci regroupe, en plus des 2 universités lilloise et liégeoise, l'Université de Picardie Jules Verne et l'INRAE. Cette association franco-belge a pour objectif principal d'exploiter l'ingénierie biologique dans les domaines de la biotechnologie, l'agriculture et l'environnement. En particulier, une des thématiques de recherche se focalise sur la mise en place de nouveaux agents de biocontrôle.

Cette thèse s'inscrit également dans le contexte du portefeuille de projets INTERREG SMARTBIOCONTROL (<http://www.smartbiocontrol.eu/>), dédié à la mise au point de nouveaux agents de biocontrôle qui, au travers de son projet BIOPROD, a contribué au co-financement du sujet de thèse avec la région Hauts-de-France.

La réalisation de cette étude a été possible grâce à la collaboration de deux laboratoires : l'Institut Charles Viollette rattaché à l'Université de Lille et le TERRA Teaching and Research Centre rattaché à l'Université de Liège. Ces deux laboratoires sont parfaitement équipés pour mener dans les meilleures conditions les expériences en microbiologie et en biologie moléculaire, ainsi que pour réaliser des analyses biochimiques.

Les travaux de thèse seront présentés dans ce manuscrit dans 5 chapitres principaux. Le premier chapitre permettra de situer le projet de thèse dans son contexte scientifique. Après avoir présenté l'impact économique des phytopathologies, les solutions envisagées y seront décrites. L'importance du biocontrôle et l'implication des souches de *Bacillus* et *Trichoderma* seront soulignées. Dans la dernière partie de cette synthèse, nous présenterons les avantages de la combinaison de différents microorganismes dans le biocontrôle et les aspects d'études *in vitro*. Le deuxième chapitre reprendra en détail les techniques utilisées dans le cadre des expériences menées dans cette étude. Les troisième et quatrième chapitres seront dédiés respectivement à la présentation des résultats obtenus et à leur discussion, en se basant sur des études antérieures portant sur des thématiques similaires. Ce manuscrit s'achèvera par une conclusion reprenant ce qui a été présenté, puis sur les perspectives envisagées à l'issue de cette recherche.

Chapitre 1

Introduction bibliographique

1. Introduction générale

La protection des récoltes a toujours été cruciale afin d'augmenter les rendements de l'agriculture et combler les besoins de l'Homme [1]. L'évolution de la biologie, et plus précisément de la microbiologie, de la biologie génétique et moléculaire, ainsi que de la chimie a permis de progresser dans le domaine de la lutte contre les pathogènes des plantes. Les outils et techniques de biologie génétique et moléculaire ont permis d'identifier les pathogènes et les causes de leur virulence (présence de gènes codant pour des protéines virulentes ou pour un mécanisme d'attaque des plantes). Les progrès en microbiologie ont permis de tester différentes hypothèses *in vitro* en reproduisant le système pathogène-plante dans le laboratoire, d'observer les effets des pathogènes sur la plante et donc mieux comprendre les mécanismes d'action. Finalement, la chimie a apporté la possibilité de formuler plus finement des produits d'intérêt. Ensemble, ces outils ont permis aux chercheurs de trouver des moyens efficaces pour lutter contre la plupart des pathogènes.

Les produits chimiques à effet microbicide ne tardèrent pas à devenir le moyen le plus utilisé dans la lutte contre les phytopathogènes. Ces produits, regroupés sous le nom de pesticides, ont montré une grande efficacité dans la protection des plantes tout en présentant de nombreux inconvénients. Par conséquent, à partir du XX^{ème} siècle, les scientifiques et les agriculteurs ont commencé à se tourner vers des solutions biologiques : le biocontrôle. Ces solutions consistent à utiliser des produits naturels ou même des organismes vivants à effet antagoniste pour lutter contre des pathogènes. Les progrès dans la biologie ont certainement permis d'optimiser leur usage. Les techniques de biocontrôle utilisant des microorganismes ont par la suite été optimisées pour augmenter l'efficacité de la lutte, avec par exemple l'utilisation de mélange de plusieurs souches bactériennes et/ou fongiques. Dans ce chapitre, un état de l'art autour des phytopathologies et des solutions chimiques et biologiques existantes sera abordé, avec une attention particulière sur les utilisations possibles de différentes souches de *Bacillus* et *Trichoderma*. Pour finir, les stratégies de coculture ainsi que leurs avantages dans le biocontrôle seront également présentées.

1.1. Les pathologies végétales

Les maladies des plantes sont généralement causées par des facteurs abiotiques, biotiques ou les deux ensembles. Le stress abiotique est causé par des facteurs environnementaux comme la sécheresse, les températures inappropriées, les carences en nutriments et la pollution. Des conséquences graves sont observées sur le développement et la physiologie de la plante [2,3].

En ce qui concerne le stress biotique, comme son nom l'indique, il est entraîné par des agents vivants ayant des effets néfastes sur la plante. Ces agents, appelés phytopathogènes, appartiennent à plusieurs branches taxonomiques. Ils peuvent être des champignons, des bactéries, des virus, des protozoaires ou des plantes parasites. Ils s'attaquent aux plantes à différents niveaux (feuilles, tiges, fruits ou racines) et entraînent des dégâts locaux ou globaux. Le mécanisme d'introduction dans la plante

diffère selon les pathogènes. Certains pénètrent dans la plante par les orifices naturels comme les stomates ou par les blessures causées par des facteurs environnementaux ou des ravageurs; mécanisme souvent favorisé par l'humidité et la température [4]. D'autres sont capables de s'introduire en perçant la paroi des plantes se créant ainsi leur propre voie d'accès. Des exemples sur les différents phytopathogènes, leur mode de fonctionnement, les modalités d'infection, ainsi que leur impact sur la plante sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Différents pathogènes causant des phytopathologies, leur mode d'action et les impacts sur la plante

Espèce	Plante cible	Modalités d'infection	Invasion du reste de la plante	Symptômes
<i>Fusarium graminearum</i> [5]	Céréale	Par des hyphes dans les parties apicales des fleurs	Non	Lésions brunes humides sur les fleurs
<i>Rhizoctonia solani</i> [6]	Tabac	Par des hyphes à travers les parois racinaires	Non	Fonte des semis
<i>Verticillium dahliae</i> [7]	Pomme de terre	A travers le cortex des racines	Oui	Perturbation de la formation des tubercules
<i>Pseudomonas syringae</i> [8]	Kiwi	A travers les hydathodes, stomates et blessures des feuilles, fleurs, lenticelles, bourgeons, coupures, pollen	Oui	Taches sur les feuilles, brunissement et mort des fleurs, mort de la plante
<i>Xanthomonas citri</i> [4]	Agrume	A travers les stomates et blessures des feuilles	Réduite	Lésions hyperplasiques avec un halo jaune
<i>Ralstonia solanacearum</i> [9]	Tomate	A travers les pointes, zones de ramifications et blessures des racines	Oui	Flétrissement de la plante
<i>tomato yellow leaf curl disease</i> [10]	Tomate	Par les mouches blanches se nourrissant du stylet	Oui	Rachitisme, chlorose, enroulement des feuilles
<i>Tobacco streak virus</i> [11]	Cotonnier	Par les grains de pollen infectés, par les thrips	Oui	Taches et anneaux nécrotiques, mosaïque

1.2. Les impacts économiques

Au fil des années, les phytopathogènes ont causé d'énormes pertes de rendement aux récoltes, causant ainsi de graves conséquences sur le plan économique. Il est estimé que 20 à 40 % du rendement agricole mondial est perdu annuellement à cause des facteurs biotiques [12], sans compter les impacts indirects sur les consommateurs, les producteurs et l'environnement qui peuvent amener jusqu'à 38 % de pertes supplémentaires [13].

Les pathogènes, infectant souvent un large éventail de plantations, sont responsables de dégâts dans différents secteurs agricoles. Les champignons pathogènes sont responsables d'un total de 20 à 40 % de pertes réparties avant et après la récolte [14]. Les pertes agricoles sont réparties inégalement sur les différents secteurs. Elles peuvent aller jusqu'à 5 % pour la production de pommes aux Pays-Bas [15] et jusqu'à 100 % pour le coton en Thaïlande [16]. Selon Rakotonindrina *et al.* (2012) et Savary *et al.* (2000), ces pathogènes impactent chaque année 5 à 95 % de la récolte de pommes de terre en France et 24 à 41 % de celle du riz en Asie [17,18].

Ainsi, dans l'optique de limiter les dégâts agricoles et leurs impacts sur le plan économique, environnemental et social, les scientifiques et les agriculteurs se sont unis pour trouver une solution pour la protection des cultures. Le système de résistance et les mécanismes de défense propres à la plante s'avérant non suffisants pour sa protection contre les pathogènes récalcitrants, des solutions auxiliaires doivent être apportées.

2. Les solutions chimiques pour la protection des cultures

2.1. Généralités

L'évolution de l'agriculture pour répondre à des enjeux commerciaux et sociétaux a été accompagnée par l'augmentation des dégâts observés sur les plantes. En effet, la mise en culture uniforme de champs vastes a permis l'émergence de nouvelles souches de pathogènes [19]. Les pesticides furent ainsi créés et définis en tant que produits chimiques ayant une activité destructrice vis-à-vis des macro, microorganismes et des plantes parasites [20]. Leur application dans l'agriculture a permis de réduire fortement l'impact des pathogènes, et en conséquence les pertes au niveau des récoltes. En effet, ces produits peuvent être utilisés à des fins curative ou protective. Ils agissent soit en inhibant rapidement la croissance des prédateurs des cultures soit en limitant leur dissémination. De plus, les pesticides sont facilement accessibles aux agriculteurs à des prix modérés [21]. Tous ces avantages constituent un fort argument pour l'application des pesticides afin de garantir de meilleurs rendements et qualités de culture. L'utilisation de ces produits est en expansion continue. Cette tendance est reflétée par la croissance du marché des pesticides d'un taux annuel composé de 4,2 % entre les années 2015 et 2019.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons à la lutte contre les champignons phytopathogènes et par conséquent aux pesticides antifongiques, aussi appelés fongicides. Actuellement, des centaines de fongicides avec des modes d'action variés sont homologués. Entre autres, ils peuvent intervenir au niveau de la synthèse des protéines, l'intégrité de la membrane cytoplasmique ainsi que sur le complexe respiratoire mitochondrial des pathogènes [22]. Actuellement, le marché global des fongicides vaut plus que 18 milliards de dollars. Sa valeur a doublé depuis 2013 [23] et une augmentation jusqu'à 24,5 milliards de dollars est prévue en 2025 [24].

2.2. Effets néfastes des fongicides

2.2.1. Risque de résistance chez les champignons pathogènes

De nombreux cas de résistances contre les fongicides sont reportés dans la littérature [25]. Cette résistance peut être expliquée par le fait que la majorité des fongicides agissent sur un seul site, variable selon le type du produit [26]. En effet, 77 % du marché des fongicides est constitué par des produits qui ciblent une seule enzyme d'un métabolisme spécifique [22]. Une simple mutation chez le pathogène au niveau du site d'action du fongicide est capable de conférer au champignon une résistance envers ce même produit. Ces mutations qui font partie du phénomène de sélection naturelle, apparaissent chez les champignons à cause de leur prolifération générant de nombreuses générations [27]. La résistance peut aussi être acquise par le développement d'un mécanisme de détoxification chez les pathogènes. Le cytochrome P450 est l'agent principal qui intervient dans ce phénomène. Une surexpression de ces enzymes est observée chez les pathogènes en contact avec des produits à effets antifongiques naturels ou chimiques. Par exemple dans le cas de *Sclerotinia homoeocarpa*, la surexpression de certaines familles du cytochrome P450 a permis d'assurer la transformation du fongicide chlorothalonil en produit non toxique [28].

2.2.2. Altération de la communauté microbienne du sol

La spécificité d'un fongicide n'est pas forcément limitée à une souche ou une espèce particulière. Ils peuvent être actifs sur d'autres microorganismes présents dans le sol [29]. Ainsi, un fongicide pourra inhiber la croissance de champignons bénéfiques ou autres en parallèle de son action contre les pathogènes. C'est le cas du fongicide Captan qui peut aussi avoir un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries du sol. A l'inverse, le cycloheximide a plutôt induit la prolifération de la population bactérienne tout en inhibant les champignons pathogènes. Ceci est dû en majorité au retrait de la compétition imposée par les champignons et l'augmentation de la disponibilité des nutriments [30].

2.2.3. Bioaccumulation dans divers éléments de l'écosystème

Les fongicides peuvent s'accumuler dans le sol, l'eau et les plantes. Leur accumulation dans la nature, sujette à différents facteurs environnementaux tels que le lessivage et la température, s'avère être persistante dans le temps. Des traces de produits dont l'utilisation est bannie depuis des années sont toujours détectées dans les ruisseaux traversant à côté des champs agricoles. Elles sont aussi observées dans

la flore et faune aquatique, engendrant de graves conséquences sur l'intégrité des écosystèmes [31]. En effet, la pollution du sol impacte son rendement à la suite de la dégradation de ses propriétés biologiques et biochimiques [32].

Quant à l'accumulation dans les organismes vivants, elle a été démontrée notamment par une étude menée au Népal sur 3 végétations différentes, montrant la présence de résidus de fongicides du groupe des carbendazimes dans la quasi-totalité des plantes testés [33]. Les fongicides accumulés dans les plantes peuvent être transférés également à d'autres produits alimentaires tel que le miel et le lait. [34–36]. Le principal risque présenté par cette bioaccumulation est l'entrée ultérieure des produits dans la chaîne de consommation et ainsi dans l'alimentation humaine.

2.2.4. Impacts sur la santé chez l'homme

Les humains peuvent être contaminés directement ou indirectement par les fongicides : directement en entrant en contact avec les produits (au moment de l'application dans les champs, en résidant près de champs agricoles) et indirectement en consommant des produits qui contiennent des résidus. Une large base de données des effets cancérigènes des pesticides est déjà établie. Entre autres, le potentiel cancérigène de ces produits chimiques sur les personnes exposées est aujourd'hui incontestable. C'est le cas, par exemple, pour les cancers des voies aéro-digestives supérieures [37].

Étant donné les nombreux inconvénients constatés après plusieurs années d'utilisation, plusieurs mesures ont été prises vis-à-vis de ces fongicides chimiques. Des réglementations ont vu le jour afin de limiter la quantité de produit utilisé et de bannir certains produits dont l'effet toxique se révèle être trop important. D'un autre côté, la substitution de ces produits chimiques par des produits d'origine naturelle semble être la solution la plus prometteuse. C'est pourquoi, la communauté scientifique porte ses efforts désormais sur le développement d'alternatives aux fongicides chimiques, en proposant de nouvelles solutions moins toxiques pour l'environnement et pour les êtres vivants.

3. Les solutions biologiques pour la protection des cultures

3.1. Généralités

Dans le but de maintenir une agriculture durable, respectueuse de l'environnement et de la santé des humains, l'utilisation de la lutte biologique est encouragée. Le terme biocontrôle, de l'anglais « Biological Control », fut ainsi désigné pour définir l'utilisation de mécanismes naturels pour stimuler la croissance de la plante et éradiquer les dangers auxquels elle est sujette [38]. Le terme agents de biocontrôle (BCA : biocontrol agent) définira ainsi les molécules (médiators chimiques, substances naturelles) ou les organismes vivants (macro et microorganismes) employés à cette fin et qui seront détaillés dans les sections suivantes. Le terme

biopesticide référera au produit final proposé sur le marché. D'après l'IBAM (International Biocontrol Manufacturers Association) en 2018, les biopesticides constituaient 8 % du marché de la vente de produits de lutte contre les pathogènes en France (**Figure 1A**).

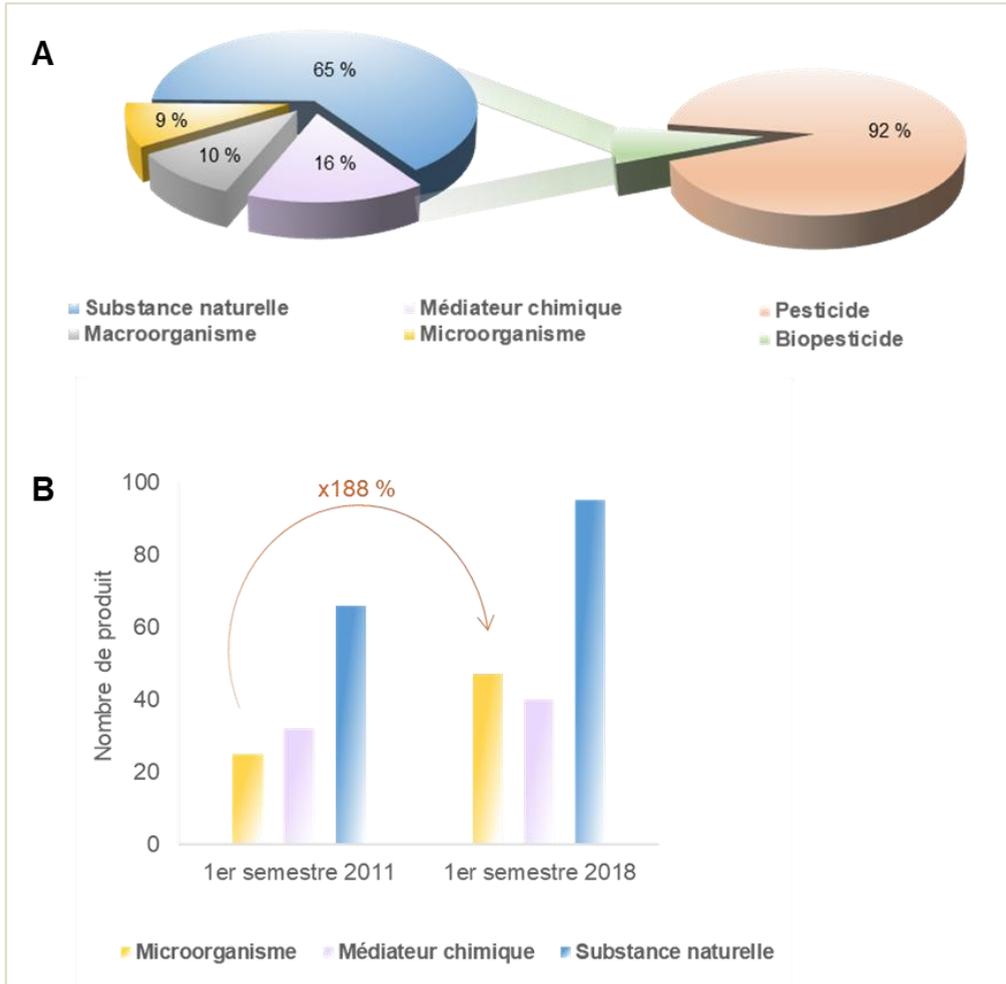


Figure 1 : Aperçu du marché du biocontrôle avec (A) la part du marché du biocontrôle dans les ventes de produit pour la protection des plantes en France en 2018 avec le pourcentage des différentes catégories de BCA (d'après l'IBAM), et (B) l'évolution du marché de biocontrôle entre l'année 2011 et 2018 (d'après Robin et Marchand, 2019)

Bien que le terme « Biocontrôle » soit récent, les moyens de lutte du biocontrôle sont utilisés depuis déjà très longtemps. L'essor de ce domaine commence à la fin des années 1900 avec la prise de conscience du danger des produits chimiques. Depuis, un développement exponentiel du marché du biocontrôle est observé. La recherche scientifique sur ce sujet s'est accentuée et le nombre d'études effectuées a augmenté

en passant de quelques articles par an en 1980 à 950 articles en 2017 [39]. En 2018, le marché du biocontrôle mondial valait 1,9 milliards de dollars (542 millions d'euros en Europe) et une croissance de 15 à 20 % est constatée chaque année [39]. Le nombre de nouveaux produits proposés sur le marché européen en cette même année est de 182, soit une augmentation de 48 % par rapport à 2011. Toutefois, ce chiffre reste inférieur à celui des nouveaux produits chimiques estimé à 312. D'après la base de données des biopesticides de la commission européenne, les substances naturelles représentent la catégorie qui comporte le plus de produits commercialisés, en comparaison avec les médiateurs chimiques et les organismes vivants (95 produits contre 40 et 47 respectivement). Cependant, l'évolution de ces produits depuis 2011 montre plutôt une préférence au niveau des produits à base d'organismes vivants dont le nombre a doublé en 2018 (**Figure 1B**) [39]. Cet intérêt accru pour les biopesticides s'explique par les avantages qu'ils présentent sur plusieurs plans, essentiellement au niveau de la présence de moins de risques pour l'environnement, les animaux et les humains.

Ainsi, la mise au point de biopesticides dont la toxicité est plus faible par rapport aux produits chimiques est un des objectifs principaux de la communauté scientifique en collaboration avec les agriculteurs et les industriels. Certains microorganismes sont considérés comme étant sans effets secondaires sur l'environnement et les humains. *Pseudomonas putida* B2017, une bactérie promotrice de la croissance de la plante, agissant sur les pathogènes de la plante, ne produit ni toxines ni antibiotiques. Son activité est entièrement due à la production de sidérophores [40].

L'un des points forts des BCAs réside aussi, en partie, dans la spécificité de leur cible. Avant d'autoriser l'utilisation d'un produit, des tests sont effectués sur différents organismes pouvant se trouver dans l'écosystème afin d'étudier la spécificité du produit. Par exemple, une vérification de la spécificité des souches de *Bacillus* ou de *Trichoderma* appliquées comme biofongicides contre *Botrytis cinerea* sur les feuilles du fraisier a permis de confirmer l'absence d'impacts sur la communauté microbienne non pathogène [41].

Un troisième critère important que les biopesticides doivent présenter concerne les temps de rémanence des produits dans les sols et sur les cultures traitées. En effet, ce paramètre est un élément crucial. Ce temps de rémanence doit être suffisamment long pour que l'action des biopesticides soit efficace mais il ne doit pas être excessif pour éviter une contamination des sols et des produits alimentaires dans le temps [42]. En moyenne, 40 jours sont nécessaires pour la dégradation des insecticides chimiques (avec un maximum de 1001 jours) alors que 6 jours sont suffisants pour la plupart des bioinsecticides avec une valeur maximale de 14 jours [43].

La multitude de modes d'action de certains agents de biocontrôle permet de diminuer le risque de développement de résistance chez les pathogènes. Au contraire des pesticides qui présentent un mode d'action ciblant un site et favorisant ainsi la génération d'une résistance chez les pathogènes, les biopesticides peuvent agir de différentes manières et réduire ainsi la capacité des pathogènes à évoluer et à s'adapter

face au BCA. Les lipopeptides produits par *Bacillus*, largement utilisés en biocontrôle, agissent de 3 façons dans la lutte contre les pathogènes : (i) aider le BCA producteur à se propager grâce à leurs propriétés surfactantes, (ii) attaquer directement les champignons pathogènes en perturbant leur membrane plasmique et (iii) stimuler la croissance de la plante [44].

Finalement, les biopesticides contenant uniquement des organismes ou produits naturels et sans modifications génétiques sont exploitables dans le cadre de l'agriculture biologique. Ce n'est bien évidemment pas le cas pour les produits chimiques conventionnels [43].

Malgré tous ces points forts, les agents de biocontrôle peuvent présenter quelques inconvénients. Par exemple, certains BCAs fongiques comme *Trichoderma viride* et *Gliocladium catenulatum* produisent respectivement de l'alaméthycine et de l'antiamoébine dont la toxicité pour les humains ainsi que pour d'autres animaux a été prouvée [45]. C'est le cas aussi pour *Bacillus thuringiensis* qui produit des hémolysines et des entérotoxines qui sont toxiques pour les cellules de mammifères et qui causent des effets indésirables chez les humains, y compris des nausées et des diarrhées [46]. Par ailleurs dans certains cas, l'action des BCAs peut ne pas être limitée au pathogène et risque de modifier la composition de l'écosystème. Parmi 4 biopesticides testés, l'azadirachtine inhibiteur de *Glomus etunicatum* a entraîné une modification de la composition en mycorhizes du sol. Dans les mêmes conditions d'application, le fongicide chimique de type carbendazime a inhibé la croissance de la totalité de la communauté mycorhizienne [47]. Enfin, l'application de microorganismes, qui sont des entités vivantes, relève de plusieurs défis quant au contrôle de leur développement après l'application, à leur activité fortement dépendante des conditions climatiques et à leur durée de vie variable. En plus de ces inconvénients d'ordre biologique, ces produits présentent parfois un coût de production plus élevé qu'un pesticide de synthèse [48].

3.2. Les médiateurs chimiques

Les médiateurs chimiques sont majoritairement utilisés pour la lutte contre les insectes ravageurs. Ils sont constitués principalement par les phéromones, les kairomones et les allomones qui jouent un rôle primordial dans système de communication entre les insectes et avec la plante. Ces médiateurs, une fois identifiés, peuvent être synthétisés et utilisés dans le cadre du biocontrôle, notamment grâce à leur spécificité de cible.

3.3. Les substances naturelles

L'utilisation de substances produites par des plantes, des macro ou microorganismes dans la lutte contre les pathogènes de la plante s'intègre dans le contexte du biocontrôle. Ces substances naturelles appartiennent à plusieurs classes et protègent la plante en adoptant différentes stratégies. Certaines stimulent les mécanismes de défense de la plante. Elles sont ainsi nommées éliciteurs et appartiennent

généralement aux classes des terpènes, phénols ou alcaloïdes [49]. Elles sont extraites des microbes, des pathogènes ou des cellules végétales subissant leur attaque. La réactivité des plantes vis-à-vis de ces molécules est relativement rapide après leur reconnaissance par les récepteurs membranaires [50]. Les résistances locale puis systémique de la plante sont alors activées [51]. Le mécanisme de défense contre les pathogènes potentiels est mis en place, ce qui engendre une réponse rapide en cas d'infection [52].

D'autres substances peuvent attaquer directement les pathogènes en inhibant leur croissance. L'huile essentielle extraite du théier est riche en plusieurs formes de terpènes dont l'activité antibactérienne et antifongique a été prouvée dans diverses études, notamment contre *Xanthomonas vesicatoria*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum*, et *Fusarium gramineis*. [53–55]. L'un des avantages de l'utilisation des huiles essentielles est le fait qu'elles présentent une multitude de modes d'action, ainsi qu'une toxicité faible vis-à-vis des espèces non ciblées (dont l'homme) [56]. En plus des huiles essentielles, des extraits de plantes (comme l'ail et les agrumes), et d'animaux (comme les crustacées) sont naturellement riches en molécules bioactives (allicine, naringine et chitosane respectivement). Leur efficacité contre différents pathogènes a été démontrée à plusieurs reprises *in vitro* et *in vivo* y compris contre les champignons du genre *Fusarium*, *Botrytis* et *Rhizoctonia* et les bactéries du genre *Agrobacterium* et *Pseudomonas* [51,57–60].

Une famille très importante de métabolites secondaires utilisée dans le biocontrôle est la famille des lipopeptides. Les caractéristiques de ces molécules seront détaillées dans la section 4.3.3, où sera également présenté leur mode de production par les bactéries du genre *Bacillus* et leur mode d'action dans la lutte biologique contre les pathogènes. L'utilisation de ces molécules est avantageuse sur plusieurs niveaux. D'un côté, les molécules sont relativement stables grâce à leur structure cyclique et l'alternation de configuration L et D des acides aminés (jusqu'à 25 jours dans un sol stérile pour la surfactine) [61,62]. D'un autre côté, leur rémanence dans le sol est suffisante pour conférer aux plantes la protection nécessaire, sans pour autant persister longtemps dans le sol. Par exemple, au cours d'une expérience en pot, l'iturine a été dégradée 17 jours après son ajout dans le sol [63].

3.4. Les macroorganismes

Inspirés par les chaînes alimentaires dans la nature, les agriculteurs et les scientifiques ont étudié l'efficacité de l'emploi de macroorganismes dans le biocontrôle de leurs proies. Pour une souche invasive pathogène ou ravageur, il apparaît prometteur d'utiliser son prédateur pour limiter ses impacts sur l'agriculture. L'application de nématophages, par exemple, est une technique efficace pour lutter contre les nématodes. Ces macroorganismes sont capables de tuer leur cible directement ou indirectement en produisant des toxines [64].

3.5. Les microorganismes

Le développement de nouveaux produits de biocontrôle à base de microorganismes suit une croissance exponentielle, bien plus importante que celle observée pour les BCAs cités précédemment [39]. Les bactéries, champignons, levures, virus et phages sont les principales familles de microorganismes utilisés. Les deux premiers sont souvent présents dans le sol et présentent des activités antagonistes. Des exemples, ainsi qu'une présentation des divers modes d'action adoptés par ces microorganismes seront présentés plus loin dans cette section.

En ce qui concerne les autres embranchements, certaines levures produisent des composés organiques volatiles, comme *Galactomyces candidum* dont la production de molécules diffusibles entraîne l'inhibition de *Botrytis cinerea in vitro* [65]. Les mycovirus, qui infectent les champignons, ont démontré une efficacité pour ralentir, voire inhiber la croissance des champignons infectés et permettre ainsi de réduire leur pathogénicité [66]. En 2019, 3 nouveaux bactériophages de la famille des *Podoviridae*, efficaces contre *Ralstonia solanacearum*, ont été découverts. Ils présentent une spécificité vis-à-vis de leur pathogène qui est remarquablement élevée [67].

Au cours de ce projet, les bactéries et champignons antagonistes et surtout ceux qui se trouvent déjà dans la rhizosphère ont été exploités. La rhizosphère est définie comme étant la fraction du sol qui entoure les racines des plantes et qui subit des modifications imposées par celles-ci [68]. Ces modifications sont en grande partie causées par la sécrétion de nutriments, surnommés exsudats racinaires, qui influencent les propriétés physiques, biochimiques et la composition microbienne de la rhizosphère [69]. Par conséquent, une partie du microbiote du sol, qui renferme des espèces diverses allant des nématodes aux algues, se développe dans la rhizosphère. Cette communauté assez complexe contient à la fois des individus sans aucun effet sur la plante, des individus qui sont pathogènes et d'autres qui sont bénéfiques [70].

Les bactéries forment le groupe dominant de microorganismes dans la rhizosphère [71]. Rares sont celles qui nuisent à la plante, du fait qu'elles ne peuvent, bien souvent, pas survivre longtemps dans le sol (à l'exception des bactéries sporulantes). De plus, leur mécanisme d'infection de la plante nécessite souvent la présence d'une plaie pour pénétrer dans la plante [70]. En revanche, les bactéries bénéfiques à la plante sont assez fréquentes et jouent un rôle primordial dans le maintien de la bonne santé de la plante. Elles interagissent avec les racines des plantes et peuvent les coloniser, favoriser leur développement, et leur conférer une protection contre les pathogènes via différents mécanismes. Elles sont surnommées PGPR de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria », signifiant les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Parmi ces bactéries, les plus connues et exploitées sont celles du genre *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azotobacter* et *Serratia* [72]. Dans cette étude, un intérêt est porté aux bactéries appartenant au genre *Bacillus*. Après avoir détaillé leurs différentes propriétés, les mécanismes dont elles se servent pour la protection des plantes seront présentés.

4. L'implication de *Bacillus* en biocontrôle

4.1. Le genre *Bacillus*

Ces bactéries appartiennent à la famille des *Bacillaceae* et à l'ordre des *Bacillales* affilié à l'embranchement des *Firmicutes* [73]. Ce sont des bactéries à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, caractérisées par leur capacité à former des endospores en aérobies quand les conditions de croissance ne sont pas favorables [74]. Ces bactéries peuvent se développer dans de nombreuses niches écologiques dans l'environnement [75]. Une grande diversité est observée au sein de ce genre, basée sur la morphologie du sporange, la taille des spores, les conditions de développement en termes de pH et température, ainsi que leur activité biochimique [76]. La souche *B. subtilis* est l'organisme modèle de ce genre. Elle est utilisée pour les recherches d'ordre génétique et elle est exploitée en agriculture et en fermentation, notamment pour son potentiel intéressant en production de molécules d'intérêt comme des biosurfactants, des enzymes et des molécules à effet biocide [73].

Dans ce projet, une attention particulière est apportée à l'espèce *B. velezensis*. Elle a été identifiée pour la première fois en Espagne, dans la rivière Vélez d'où lui vient son nom [77]. Son adaptation facile aux conditions de culture en laboratoire, sa croissance rapide, sa non-pathogénicité pour l'homme, les animaux et l'environnement, font de cette souche un sujet d'étude intéressant pour la recherche. De plus, les analyses menées sur son génome ont montré un grand potentiel de production de molécules d'intérêt [73]. En effet, 8,5 % du génome de *B. velezensis* FZB42, la souche modèle, est dédié à la production de métabolites secondaires dont certains présentent des activités antimicrobiennes [78].

4.2. Le biofilm, un mode de vie avantageux

Une caractéristique supplémentaire et remarquable de *B. velezensis* est sa capacité à former des biofilms sur les racines des plantes. Un biofilm est décrit comme étant une structure attachée à une surface et formée de cellules sédentaires, reliées entre elles par une matrice à base de substances polymériques extracellulaires (EPS pour Extracellular Polymeric Substances) qui assurent l'intégrité du biofilm [79]. La formation des biofilms nécessite 4 étapes essentielles (adhésion, accumulation, maturation, dispersion) qui sont présentées dans la **Figure 2**.

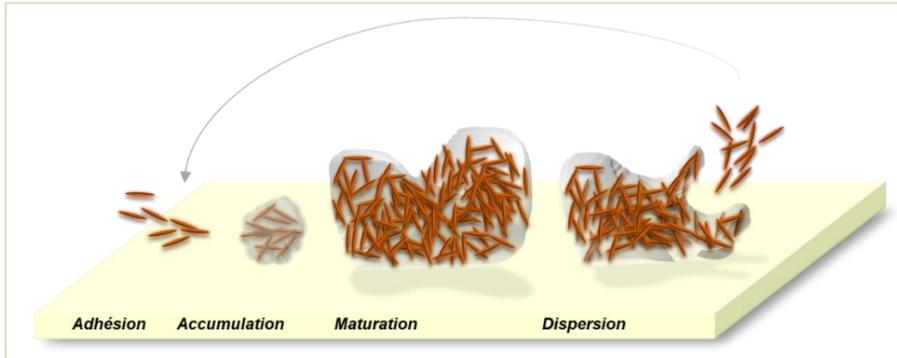


Figure 2 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm comprenant l'adhésion des cellules sur le support, le développement des cellules et la production de polymères exocellulaires, la maturation du biofilm et la dispersion des cellules (d'après Kolter, 2010)

Les cellules au sein de cette communauté structurée présentent un mode de vie adapté où elles subissent des différenciations et des régulations afin de partager les tâches. À part les avantages que ce mode de vie présente sur les bactéries en termes de (i) protection contre les facteurs extérieurs représentés par les agents antimicrobiens, les toxines, les stress physico-chimiques etc, (ii) augmentation de la disponibilité des nutriments qui peuvent circuler dans la matrice du biofilm et (iii) transfert de gènes pour optimiser l'activité de la structure [80], le développement des bactéries en biofilm augmente également leur efficacité en biocontrôle. Leur attachement à la racine et la colonisation de sa surface permet d'un côté de limiter les points d'accès aux pathogènes et d'un autre côté une meilleure diffusion des métabolites secondaires vers la plante et vers les pathogènes [81]. La concentration des métabolites piégés dans les EPSs augmentera, évidemment, l'activité antagoniste des BCAs [82]. Dans le cas de la PGPR *B. velezensis* FZB42, les cellules forment des biofilms fins dont les cellules sont fortement mobiles sur les racines de plantes. Cette motilité est attribuée à la production de surfactine, un biosurfactant [83]. L'activité de « swarming » importante permet à la souche de coloniser rapidement les racines, ce qui s'avère très intéressant du point de vue du biocontrôle [84]. Dans l'étude d'Al Ali *et al.* (2018), l'importance de la formation de biofilm pour la colonisation des racines et par la suite l'efficacité en biocontrôle a été démontrée en comparant le développement de la souche avec un mutant ne produisant pas d'EPSs [83]. En outre, la comparaison du transcriptome d'une souche FZB42 développée en biofilm ou en mode planctonique sur les racines a montré une surexpression de l'opéron codant pour la résistance à la bactériocine du genre nisine en biofilm, ce qui apporte la preuve que ce mode de vie confère une protection aux cellules [81]. Cette même étude a montré qu'en plus de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, le mode de vie sessile induit la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse de la bacilylsine, un dipeptide à activité antifongique et antibactérienne. La production de l'antibiotique kanosamine par *B. subtilis* et de composés organiques volatiles antagonistes par *B. amyloliquefaciens* SQR9 est également augmentée quand les bactéries se développent en biofilm [85,86].

4.3. Modes d'action contre les pathogènes

En ce qui concerne leur implication dans le biocontrôle, *B. velezensis* constitue une des espèces de *Bacillus* les plus exploitées. L'intérêt porté à cette espèce est lié à son efficacité remarquable contre de nombreux phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et *Plasmodiophora brassicae* [87–89]. La diversité des modes d'action joue un rôle primordial dans la performance de *Bacillus* pour la protection des plantes. Ils peuvent être divisés en deux groupes selon leur cible : le pathogène ou la plante. La production de molécules variées ayant des activités antagonistes inhibant la croissance et la prolifération des pathogènes ainsi que stimulant les mécanismes de défense et la croissance des plantes constitue la voie essentielle de lutte contre les pathogènes. Ces molécules appartiennent à différentes familles et agissent sur plusieurs niveaux. Les plus connues sont les composés organiques volatiles (COV), les bactériocines, les antibiotiques, les sidérophores, les polykétides et les lipopeptides [90]. Les modes d'action de *Bacillus* sont résumés dans la **Figure 3**.

Microorganisme	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
Stimulation des défenses naturelles	Activation des défenses locales : accumulation des ROS Propagation de la RSI dans la plante Surexpression des gènes de LOX et PAL Activation des voies de l'AJ, AS et ET	
	Accumulation des composés phénoliques et d'enzymes antioxydantes Induction des gènes impliqués dans la biosynthèse de chitinase, glucanase, peroxydase et cellulase	
Stimulation de croissance	Décontamination du sol	
	Production de COV Régulation de la production de phytohormones Acquisition des nutriments par les sidérophores	
Production de biocides	COV Amylolysine Macrolactine Difficidine Bacillaene Chlorotétaine Surfactine Fengycine Iturine	COV 6PP Harzianopyridone Acide harzianique Harzianolide Peptaibols
Production d'enzymes	Chitinase Glucanase Protéase	
Compétition pour les nutriments	Sidérophore : bacillibactine	Sidérophore : acide harzianique Solubilisation des nutriments

Figure 3 : Les différents modes d'action employés par *Bacillus* et *Trichoderma* dans le biocontrôle

4.3.1. Les composés organiques volatiles

La première famille de molécules, les COVs, renferme des molécules lipophiles de faible masse moléculaire (inférieure à 300 Da) [91]. Ils ont été détectés chez plusieurs souches de *B. velezensis* dont *B. velezensis* ZSY-1 et G341. Les phénols et pyrasines produits par la souche ZSY-1 assurent une activité antifongique contre *Botrytis cinerea* et *Alternaria solani* [92]. Quant à la seconde souche, elle produit des COVs sulfurés, du butanol et du butanone qui ont inhibé la croissance des pathogènes du genre *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Sclerotinia*, et *Rhizoctonia* [93].

Les COVs ont aussi un effet antifongique protecteur des fruits après la moisson. *B. velezensis* BUZ-14 et I3 inhibent la croissance des champignons du genre *Monilinia* et *Botrytis* par la production des COVs de la famille des éthyles et des aldéhydes [94].

4.3.2. Les bactériocines

Les bactériocines sont définies comme étant des peptides produits par les bactéries par voie ribosomique et ayant une activité toxique vis-à-vis d'autres bactéries [95]. Chez *B. velezensis*, quelques bactériocines ont été identifiées (plantazolicine, amylocyclicine, amylolysine...) [96–98]. L'amylolysine produite par la souche GA1 est active contre les bactéries comme *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. Cette bactériocine génère des pores dans la membrane cellulaire des pathogènes [99].

4.3.3. Les NRPs et les PKs

Les autres familles de métabolites présentent une particularité commune. Elles sont toutes synthétisées par un mécanisme de synthèse original découvert en 1971 et nommé mécanisme thiotemplate ou nonribosomique [100]. Ainsi, ces métabolites ne sont pas produits par les ribosomes mais assemblés par des complexes enzymatiques appelés des synthétases de peptides nonribosomiques (NRPS pour l'anglais NonRibosomal Peptide Synthetase) et des synthèses de polykétides (PKS pour l'anglais Polyketide Synthase).

Ces complexes multi-enzymatiques sont, quant à eux, synthétisés par la voie ribosomique classique. Ils sont obtenus après transcription, traduction et maturation. Ces complexes sont codés par des opérons pouvant atteindre la taille de dizaine de kilobases. Plusieurs modules figurent dans ces complexes enzymatiques, et chacun est constitué de plusieurs domaines présentant des activités différentes. Chaque module est responsable de la reconnaissance d'un monomère, de son activation et de l'établissement de la liaison avec le monomère reconnu par le module précédent. Les monomères ne sont pas limités aux acides aminés protéogéniques. En plus de ces derniers, les NRPSs peuvent en assembler des versions modifiées (notamment méthylés, hydroxylés ou épimérisés) ainsi que d'autres monomères dont l'acide 2-aminoisobutyrique, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque et l'hydroxyphénylglycine [101]. Quant aux PKSs, ils sont capables de reconnaître uniquement deux monomères : propionyl-CoA et 2S-méthylmalonyl-CoA et non pas les acides aminés [102].

Au niveau de l'organisation des modules des NRPSs, 4 domaines principaux existent, auxquels peuvent s'ajouter 1 à 5 domaines accessoires. Les domaines principaux sont constitués par les domaines d'adénylation, de thiolation, de condensation et thioestérase ayant les activités suivantes :

- Le domaine d'adénylation reconnaît le monomère et l'active en amino-acyl adénylate suite à une réaction avec une mole d'ATP [103]. Un amino-acyl adénylate est obtenu. Ce domaine présente une certaine spécificité pour le monomère activé [104,105].

- Le domaine de thiolation, appelé aussi PCP (pour l'anglais Peptidyl Carrier Protein) sert à la fixation de l' amino-acyl adénylate. La fixation se fait au niveau du groupe sulfhydryle du bras phosphopantéthéinique ajouté à la NRPS lors des modifications post-traductionnelles. L'ajout de ce bras est catalysé par une phosphopantéthéine transférase codée chez *Bacillus* sp. par le gène *sfp*. Sans cette modification, les synthétases ne sont pas actives et ne peuvent pas fixer le monomère [106]. Un lien thioester est réalisé entre l'extrémité du bras phosphopantéthéinique et le monomère précédemment activé [107,108]. Aucune spécificité au substrat n'a été observée pour ce domaine [104].
- Le domaine de condensation catalyse la formation d'une liaison peptidique entre les monomères reconnus par des modules adjacents [104]. Il contient deux sous-domaines dans lesquels s'abritent respectivement les monomères fixés sur les bras phosphopantéthéiniques des domaines de thiolation de part et d'autre [109]. L'établissement de cette liaison au niveau du groupe carbonyle du premier monomère, effectuant sa liaison au bras, permet son détachement de celle-ci. Ce domaine est spécifique de son substrat [110].
- Le domaine thioestérase, se situe à la fin de la NRPS et permet le détachement du peptide nonribosomique (NRP) du domaine de thiolation final par hydrolyse du lien thioester [111,112]. Pour certains NRPs, la libération est accompagnée d'une cyclisation [113].

L'activité de ces domaines ainsi que le mécanisme de synthèse des NRPs sont présentés dans la **Figure 4**.

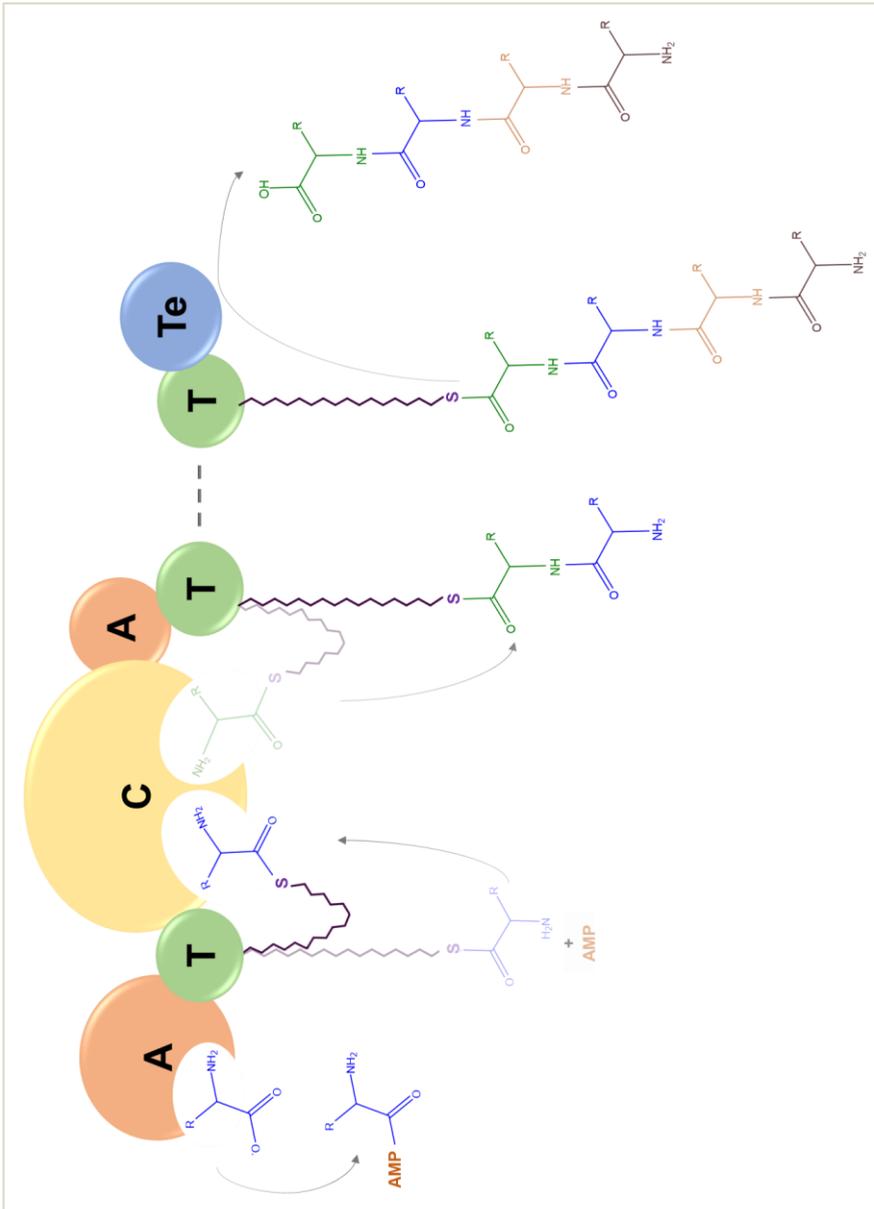


Figure 4 : Présentation des principaux domaines NRPS impliqués dans le mécanisme de la synthèse non-ribosomique : les domaines d’adénylation (A) responsable de la reconnaissance du monomère et de son activation en amino-acyl adénylate, de thiolation (T) responsable de la fixation de l’ amino-acyl adénylate au niveau du groupe sulfhydryle du bras phosphopantéthénique, de condensation (C) responsable de la catalyse de la formation d’une liaison peptidique entre les monomères reconnus par des modules adjacents et finalement le domaine de thioestérase (Te) impliqué dans la libération du NRP du domaine de thiolation final par hydrolyse du lien thioester (d’après Vassaux, 2019 [114])

L'activité des domaines accessoires est souvent associée à la modification des monomères du NRP. Le domaine d'épimérisation permet de transformer les L-acides aminés activés en leur énantiomère D [115]. Les domaines de méthylation et de formylation ajoutent un groupement méthyl et un groupement formyl respectivement sur l'acyl thioester [116,117]. Le domaine de cyclisation, structurellement très proche du domaine de condensation, permet la cyclisation de certains monomères ou groupe de monomères [103]. Les domaines accessoires décrits ci-dessus sont ceux les plus fréquemment retrouvés au sein des NRPSs, néanmoins il en existe d'autres dont l'occurrence est bien moins fréquente [118].

Pour les PKSs, les domaines principaux et accessoires diffèrent en partie de ceux des NRPSs [119]. La structure des PKSs ne sera pas décrites en détails, car les PKSs ne font pas partie des molécules d'intérêts étudiées dans le cadre de ce projet de thèse. Il est néanmoins important de souligner que la souche *B. velezensis* GA1 produit de la macrolactine, de la difficidine et de la bacillaene [120]. La macrolactine est un polykétide qui présente des activités antifongiques contre de nombreux pathogènes [121]. L'effet antibactérien de la difficidine a été démontré contre *Xanthomonas oryzae* [122]. Finalement, la bacillaene inhibe la synthèse des protéines uniquement chez les procaryotes, et par conséquent inhibe le développement de certaines bactéries pathogènes [123].

Parmi les NRPs, 3 types de molécules sont produites : les antibiotiques, les sidérophores et les lipopeptides. La chlorotétaine, un dérivé chloré de la bacilysine, représente la forme d'antibiotique produite par *B. velezensis* GA1. Son efficacité a été démontrée contre *Xanthomonas oryzae* [122,124]. La bacilysine est produite par *B. velezensis* FZB42 et présente des effets similaires à ceux de son dérivé chloré. Elle est aussi efficace contre des algues et cyanobactéries comme *Microcystis aeruginosa* [125]. Au niveau des sidérophores, la forme produite est la bacillibactine [120]. Ce NRP est capable de chélater le fer disponible dans le sol, et le rendre ainsi inexploitable par les autres organismes du sol [126]. Le mode d'action des sidérophores consiste alors à créer une compétition pour le fer entre les différentes bactéries et les champignons présents dans le sol [127].

Les lipopeptides (LPs) constituent la famille de métabolites majoritairement étudiée au cours de ce projet. Ce sont des NRPs particuliers puisqu'ils présentent sur leur extrémité N-terminal une chaîne lipidique [128]. Cette chaîne est insérée au début du mécanisme d'assemblage par un domaine de condensation initiale qui se trouve dans le premier module de la NRPS correspondante [129]. Les opérons codants pour ces NRPSs contiennent plusieurs séquences codantes distinctes. Les interactions protéine – protéine qui assure la synthèse complète du NRP par les différentes unités du NRPS se fait grâce au domaine COM (pour l'anglais communication-mediating domain) qui se trouve au niveau l'extrémité N-terminale de l'unité en amont et de l'extrémité C-terminale de l'unité en aval [130]. Les trois familles principales de lipopeptides cycliques chez *Bacillus* sont les surfactines, les fengycines et les iturines. Ces LPs présentent de grandes particularités structurales qui conduisent à des activités biologiques différentes.

4.3.3.1 Les surfactines

Les NRPSs des surfactines sont encodées par l'opéron *srfA* formé de 4 gènes : *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* et *srfAD* [131]. D'un point de vue structural, les membres de la famille de surfactine sont composés d'une chaîne peptidique de 7 acides aminés L-Glu – L-Leu – D-Leu – L-Val – L-Asp – D-Leu – L-Leu cyclisée par l'ajout d'une chaîne d'acide gras β -hydroxylée de taille variant entre 12 et 17 atomes de carbone (Figure 5) [132].

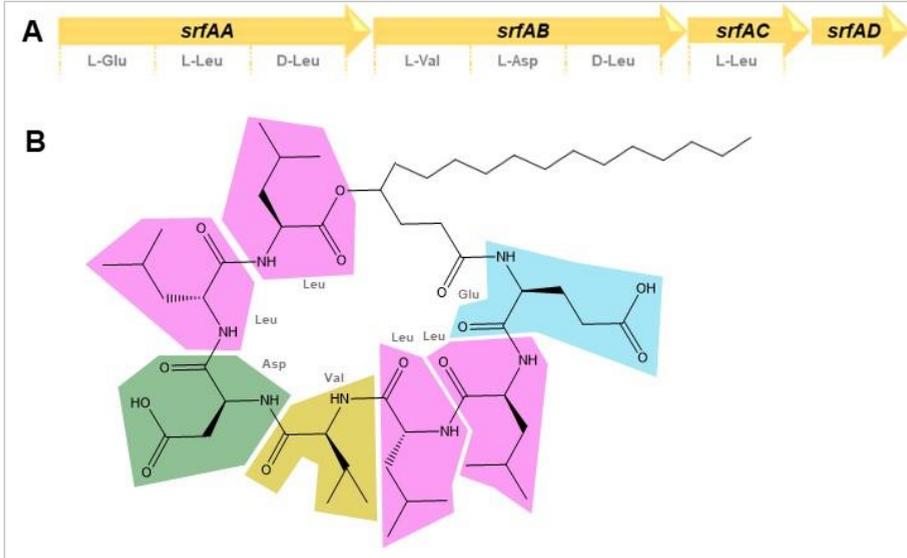


Figure 5 : (A) Opéron *srfA* formé de 4 gènes : *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* et *srfAD* codant pour les synthétases nonribosomiques responsables de l'incorporation des 7 monomères composant la surfactine, (B) Structure cyclisée de la surfactine présentant une chaîne d'acide gras linéaire de 16 atomes de carbone (la taille de la chaîne d'acide gras pouvant varier de 12 à 17 atomes de carbone) (d'après Peypoux *et al.*, 1999)

La différence entre les différentes formes de surfactine vient principalement de la composition de la chaîne peptidique et la longueur de la chaîne lipidique qui peuvent impacter l'activité de la molécule. À titre d'exemple, les surfactines ayant des chaînes lipidiques composées de 12 ou 13 carbones ne déclenchent pas de mécanismes de défense chez le tabac, contrairement aux surfactines avec 14 et 15 atomes de carbone [133].

L'expression de l'opéron *srfA* est régulée par plusieurs facteurs dont le ComA qui interagit avec le promoteur de l'opéron et contrôle la synthèse de la surfactine. Une plus grande concentration de ce facteur de transcription stimule la synthèse de la surfactine. La concentration de ComA dans la cellule est dépendante de la molécule de quorum sensing ComX produite en fonction de la densité cellulaire. Ainsi, pour une plus grande densité cellulaire, une meilleure production de surfactine est observée [134].

Ce NRP, doté d'importantes propriétés biosurfactantes, intervient dans le biocontrôle via différents mécanismes. Excepté leur implication dans l'écologie de la souche productrice (mobilité, formation de biofilm...), les surfactines sont connues pour leur efficacité dans la stimulation de la résistance systémique induite (RSI) des plantes, les rendant ainsi plus résistantes aux futures infections [44]. Les mécanismes de résistance de la plante sont à la base activés par les pathogènes, en particulier par les molécules qu'ils produisent ou qu'ils prélèvent à la plante [135]. Dans un premier temps, ces mécanismes sont activés localement au site de l'infection et pourront se propager ensuite dans d'autres sites non infectés de la plante [136]. Dans ce cas, il s'agit de résistance systémique acquise (RSA) qui vise la réduction de la propagation du pathogène [44]. Au cours de l'activation de la RSI chez le tabac par la surfactine, il a été démontré que la perception de ce lipopeptide est possible grâce à l'affinité entre sa chaîne lipidique et les lipides de la membrane cytoplasmique des cellules végétales. La surfactine s'insère et déstabilise ainsi la membrane cellulaire [133]. Cette intrusion, ne causant pas pour autant la mort des cellules, provoque une alcalinisation du milieu extérieur et une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à un influx d'ions de calcium. Les ROS produits déclencheront la RSA d'un côté [137], stimuleront la production de composés antimicrobiens par la plante et la dégradation des cellules de l'autre côté [138,139]. Le traitement de la plante avec la surfactine active aussi les enzymes LOX (lipoxygénase) et PAL (phénylalanine ammonium lyase) [140]. L'activation de LOX constitue un mécanisme de défense de la plante en présence d'un stress biologique [141]. Cette voie entraîne la production de molécules toxiques pour les champignons et la production de l'acide jasmonique et de l'éthylène [142]. L'enzyme PAL intervient dans le cadre d'une voie métabolique engendrant la production de métabolites antifongiques et l'acide salicylique [143]. Les acides jasmonique et salicylique activent le régulateur de transcription NPR1 [144]. Ce régulateur n'induit pas systématiquement l'expression des gènes impliqués dans la résistance de la plante si son activation n'est pas d'origine pathogénique [145]. L'activation du régulateur préalablement à l'infection de la plante permettra à celle-ci d'apporter une réponse plus rapide lorsque l'infection se manifestera. Plusieurs études ont démontré l'implication de la surfactine dans l'activation de la RSI. Rahman *et al.* (2015) ont mis en évidence une activation de ces mécanismes de défense chez l'ivraie vivace suite à la perception de la surfactine, ce qui a engendré une meilleure protection contre le champignon pathogène *Magnaporthe oryzae*, agent de la pyriculariose [146]. De la même manière, la surfactine de *B. velezensis* S499 confère une protection du blé contre *Zymoseptoria tritici* [147]. Le mécanisme d'induction de la résistance chez les plantes est représenté dans la **Figure 6**.

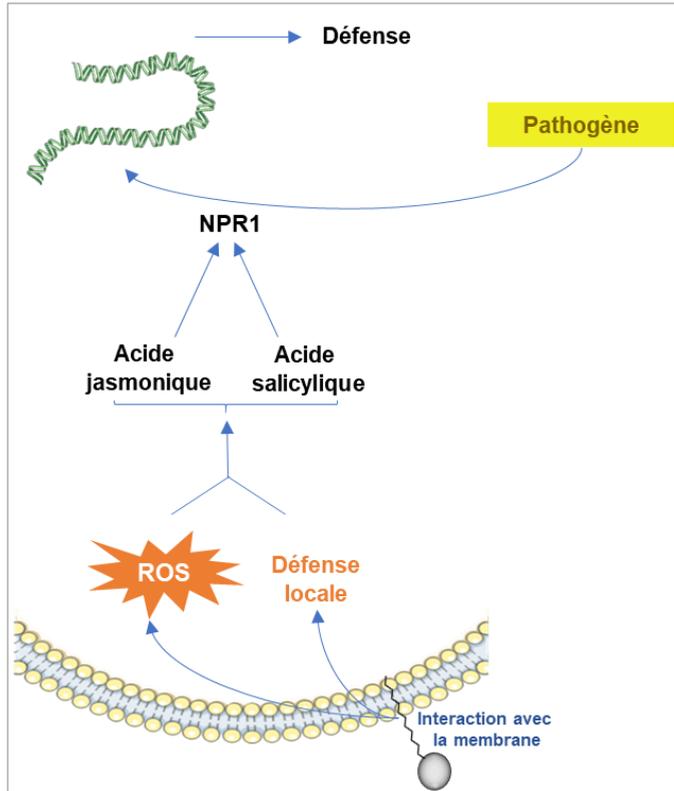


Figure 6 : Mécanisme d'induction de la résistance chez les plantes par la surfactine : l'interaction de la surfactine avec la membrane cytoplasmique des cellules végétales induit les mécanismes de défense locale ainsi que la production de ROS. Ces inductions provoquent la production d'acides jasmonique et salicylique, activant le régulateur de transcription NPR1. La perception ultérieure du pathogène stimulera plus rapidement l'expression des gènes liés aux mécanismes de défense de la plante (d'après Ongena et Jacques, 2008).

En outre, les surfactines ne possèdent pas d'activités antifongiques mais peuvent augmenter l'efficacité des iturines par interaction synergique. La surfactine favorise l'adsorption de l'iturine et grâce à ses propriétés surfactantes facilite sa dispersion [148]. Cependant, des activités antibactériennes sont discernées contre plusieurs pathogènes. L'implication de la surfactine produite par *B. subtilis* 9407 dans son activité contre *Acidovorax citrulli*, la bactérie responsable de la tache bactérienne des fruits chez les cucurbitacées a été démontrée par une étude comparative entre la souche de *Bacillus* sauvage et un mutant ne produisant pas de surfactine [149]. Également, la production de surfactine par *B. subtilis* 6051 a été associée à une augmentation de l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas syringae* sur les racines d'*Arabidopsis* [150].

4.3.3.2 Les fengycines

Les fengycines sont composées d'une chaîne peptidique cyclique comprenant 10 acides aminés : L-Glu – D-Orn – L-Tyr – D-Thr – L-Glu – D-Ala/Val – L-Pro – L-Gln – D-Tyr – L-Ile attachée à une chaîne lipidique β -hydroxy de taille variant entre 14 et 18 atomes de carbone [151]. L'opéron de cette synthétase est constitué de 5 séquences codantes *fenA* à *fenE* (**Figure 7**) [152]. Différentes isoformes existent et varient selon la composition en acides aminés et le nombre d'atomes de carbone composant la partie lipidique.

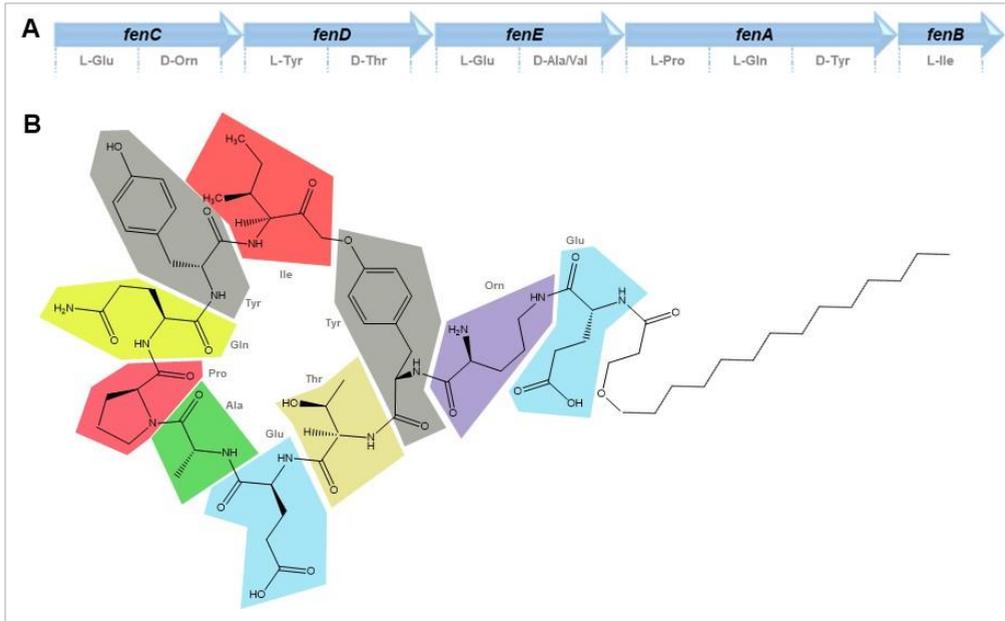


Figure 7 : (A) Opéron *fen* formé de 5 gènes : *fenA*, *fenB*, *fenC*, *fenD*, *fenE* codant pour les synthétases nonribosomiques responsables de l'incorporation des 10 monomères composant la fengycine, (B) Structure cyclisée de la fengycine présentant une chaîne d'acide gras linéaire de 14 atomes de carbone (la taille de la chaîne d'acide gras pouvant varier de 14 à 18 atomes de carbone) (d'après Ongena *et al.* 2005)

Les fengycines interagissent avec les plantes et induisent la RSI comme les surfactines [153]. La fengycine produite par *B. velezensis* FZB42 a permis l'inhibition de la croissance de *Sclerotinia sclerotiorum* grâce à l'induction de la production de ROS chez la tomate [154]. Ce LP représente l'éliciteur le plus efficace parmi les 3 LPs produits par *Bacillus sp.* Il stimule l'accumulation de la tyrosine, l'acide chlorogénique, l'acide férulique et cinnamique chez la pomme de terre [151]. Ces composés phénoliques intervenant sur différents niveaux du métabolisme des phénylpropanoïdes induisent la synthèse de la lignine et par la suite rendent les cellules plus résistantes en rigidifiant leur paroi [155].

Les fengycines sont connus notamment pour leur activité antifongique. Cette activité peut être reliée à leur structure amphiphile qui leur permet d'interagir avec les stérols et les phospholipides de la membrane des champignons. Cette action déstructure la membrane cellulaire, y crée des pores et rend les cellules plus perméables et fragiles face à d'autres molécules antifongiques produites [156]. De plus, la fengycine peut causer l'apoptose et la nécrose des cellules du pathogène selon un processus concentration-dépendant. L'action de *Bacillus* contre différents pathogènes fongiques a été attribuée à ce LP. Par exemple, Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012) ont montré en utilisant des mutants que les fengycines produites par *B. subtilis* CPA-8 sont des agents efficaces dans la lutte contre *Monilinia* [157]. De même, *Botryosphaeria dothidea*, responsable de la pourriture annulaire de la pomme, a été efficacement inhibé par une souche de *B. subtilis* produisant de la fengycine [158].

4.3.3.3 Les iturines

La chaîne peptidique cyclique des iturines renferme 7 acides aminés reliés à une β -amino chaîne lipidique de 14 à 17 atomes de carbones [151]. L'opéron de l'iturine est composé par 4 séquences codantes : *ituA*, *ituB*, *ituC* et *ituD* [159]. Les acides aminés qui rentrent dans la composition de ce lipopeptide sont L-Asn – D-Tyr – D-Asn – L-Gln – L-Pro – D-Asn – L-Ser (**Figure 8**).

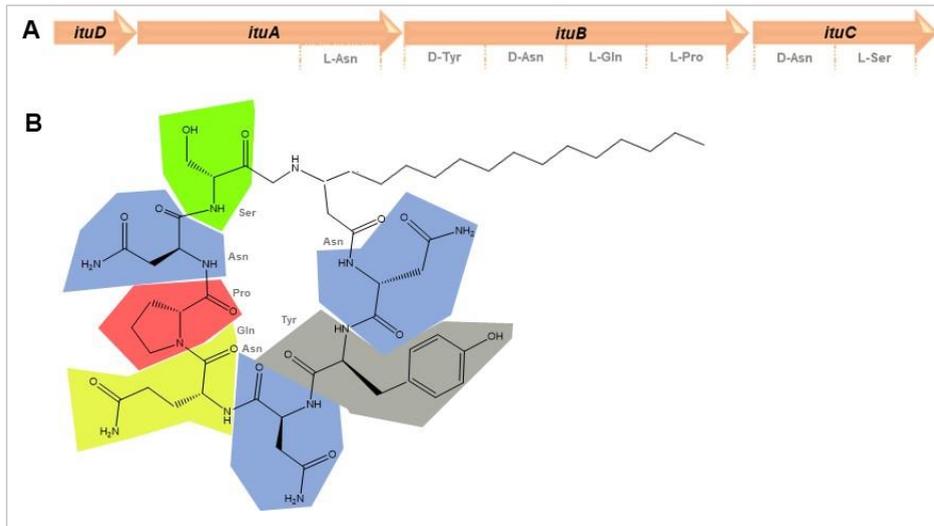


Figure 8 : (A) Opéron *itu* formé de 4 gènes : *ituA*, *ituB*, *ituC*, *ituD* codant pour les synthétases nonribosomiques responsables de l'incorporation des 7 monomères composants l'iturine, (B) Structure cyclisée de l'iturine présentant une chaîne d'acide gras linéaire de 16 atomes de carbone (la taille de la chaîne d'acide gras pouvant varier de 14 à 17 atomes de carbone) (d'après Tsuge *et al.*, 2005)

Comme pour les autres LPs, la substitution de certains monomères ainsi que la taille de la chaîne lipidique engendre l'existence de plusieurs isoformes. La synthèse de l'iturine est aussi dépendante du facteur ComA et par conséquent de la densité cellulaire [160].

L'activité biocide des iturines se résume à l'induction de la RSI chez les plantes et à l'inhibition de la croissance des pathogènes. Le déclenchement de la défense de la plante se fait par des mécanismes similaires à la surfactine et la fengycine : les voies métaboliques de l'acide jasmonique et l'acide salicylique sont activées [161]. Cependant, la manière dont l'iturine est perçue par la plante n'est pas encore bien élucidée. Il est toutefois déjà établi que cette perception est spécifique à certaines plantes et requiert l'interaction avec la membrane cytoplasmique [162]. D'après Ongena et Jacques (2018), l'iturine n'est pas l'activateur principal des réponses de défense chez les plants de tabac, de tomate, de concombre et les pomme de terre [44], au contraire du poivron, de la fraise et d'*Arabidopsis* [161–163]. L'hypothèse émise est que la perception est dépendante de la composition lipidique de la membrane cellulaire végétale ainsi que de la chaîne lipidique de l'iturine [161].

Parallèlement, l'iturine est considérée dans le biocontrôle de part son activité antifongique. Elle interagit avec les composants lipidiques de la membrane du champignon (stérols et phospholipides). Elle est capable d'y former des pores et d'augmenter leur perméabilité [164]. Par exemple, la croissance de l'agent du mildiou des feuilles de maïs, *Bipolaris maydis*, est inhibée *in vitro* et *in vivo* par l'iturine. Les résultats obtenus montrent notamment un effet plus important que celui observé avec le pesticide chlorothalonil [165]. L'efficacité de l'iturine a également été prouvée contre *Rhizoctonia solani* [63] et *Verticillium dahliae* [166]. En plus des champignons filamenteux, l'iturine présente une activité contre certaines levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* [167]. La mycosubtiline, un membre de la famille des iturines, est également connue pour son activité antifongique remarquable [168].

Les fengycines et les iturines sont les molécules clés impliquées dans l'effet antagoniste vis à vis des phytopathogènes [169]. Leur efficacité varie selon le pathogène. Kang *et al.* (2018) ont démontré que l'iturine est plus efficace que la fengycine dans l'inhibition de *Colletotrichum* sur le poivron tandis que la fengycine est plus efficace dans l'inhibition de *Fusarium* sur la tomate [170].

L'interaction de *Bacillus* avec le pathogène conduit à une augmentation de la production des lipopeptides. La production de fengycine a été augmentée d'un facteur de 10 en présence du pathogène *Rhizomucor variabilis* [171]. L'interaction de *Bacillus* avec *P. syringae* a aussi induit la production de surfactine par *Bacillus* [150].

4.3.4. Les enzymes

B. velezensis est capable de produire des enzymes de la famille des β -glucanase, chitinase, cellulase, et amylase. Ces enzymes possèdent des activités antifongiques [172] qui seront décrites dans la section 5.2.

4.3.5. Promotion de la croissance des plantes

Les rhizobactéries du genre *Bacillus* sont impliquées dans la stimulation de la croissance de la plante en facilitant l'acquisition des nutriments par cette dernière, en améliorant la qualité du sol et en produisant des COVs et des phytohormones [173,174]. Le biocontrôle des pathogènes est aussi considéré comme un mécanisme de promotion de la croissance.

Le phosphore et l'azote sont parmi les éléments essentiels pour la croissance de la plante. En général, la disponibilité de ces molécules est limitée dans le sol et leur absorption par les racines des plantes n'est pas systémique [175,176]. Le phosphate intervient dans plusieurs voies métaboliques chez la plante telles que la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides et des adénosine triphosphates [177]. Présent sous forme minérale inassimilable par les plantes, la production de phosphatases et d'acides organiques par *Bacillus* contribue à sa conversion en forme assimilable par la plante [178,179]. Quant à l'azote nécessaire à la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés et des composants de la plante, *Bacillus* le rend disponible sous forme d'ammonium à partir des composés organiques azotés [180] ou tout simplement en le fixant à partir de l'atmosphère sous forme de N₂ [181]. Le fer constitue aussi un minéral dont l'acquisition par les végétaux est améliorée par *Bacillus* grâce à la production des sidérophores. Le fer est important pour la synthèse d'acides nucléiques ainsi que pour la respiration et la photosynthèse des plantes [182].

La présence de ce genre de bactérie dans le sol renforce la résistance de la plante à la sécheresse puisque la bactérie favorise le transport de l'eau vers la plante [183]. En outre, *Bacillus* limite les dégâts causés par les ROS, produits en réponse au stress hydrique, via la production d'antioxydants [184].

La contamination du sol par certains métaux toxiques (le cuivre et le zinc par exemple), provenant notamment des industries, est très fréquente [185,186]. Cette contamination affecte le développement des plantes. Les bactéries du genre *Bacillus* possèdent le bagage nécessaire pour solubiliser les métaux contaminants et réduire leur toxicité en les oxydant par exemple de leur forme sulfide en sulfate dans le cas des métaux sulfurés [187,188].

Les souches de *Bacillus* produisent des COVs, des phytohormones impliqués dans la croissance de la plante tels que les gibbérellines et l'acide indole-3-acétique ou des précurseurs de ces dernières [189,190]. En conséquent, l'élongation et le grossissement des racines sont stimulés, l'acquisition des nutriments améliorée et la croissance des plantes promue [191]. La production de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase permet aussi de stimuler le développement des plantes en inhibant la production de l'éthylène [192,193]. Cette hormone est produite en condition de stress et inhibe en parallèle la croissance des feuilles [194].

4.4. Produits de biocontrôle commercialisés à base de *Bacillus*

Des centaines de produits phytosanitaires à base des souches de *Bacillus* sont actuellement disponibles sur le marché mondial. En France et en Belgique, 46 produits sont autorisés et utilisés comme bactéricides, fongicides, insecticides et promoteurs de croissance. En particulier, les produits biofongicides, leurs compositions et les pathogènes cibles (indiqués dans leur fiche d'homologation) sont repris dans le **Tableau 2**. Cette liste est établie en se basant sur celles publiées par (i) la direction générale de l'alimentation, service des actions sanitaires en production primaire en France, et (ii) par le site web officiel du service public fédéral de la santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement en Belgique (Phytoweb.be).

Tableau 2 : Les produits de biocontrôle à base de *Bacillus* sur les marchés français et belge : la souche de *Bacillus* qu'ils renferment ainsi que le pathogène contre lequel chaque produit est homologué (d'après la direction générale de l'alimentation, service des actions sanitaires en production primaire en France et le site web officiel du service public fédéral de la santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement en Belgique)

Nom du produit	Souche de biocontrôle	Cible
TAEGRO	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24	<i>Botrytis</i> , <i>Oïdium</i>
INTEGRAL PRO	<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI600	<i>Phoma</i>
SERIFEL	<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI600	<i>Trichodorus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i>
AMYLO-X WG	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D747	Bactériose, <i>Monilinia</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Stemphylium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Trichoderma</i> <i>agressivum</i> , <i>Oidium</i>
AMYLO-X JARDIN	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D747	<i>Botrytis</i> , <i>Oïdium</i>
VALCURE	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D747	<i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Fusarium</i>
BALLAD	<i>B. pumilus</i> QST 2808	<i>Sclerotinia</i>
SONATA	<i>B. pumilus</i> QST 2808	<i>Oïdium</i>
SERENADE ASO	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>Botrytis</i> , <i>Oïdium</i> , <i>Sclerotinia</i>
RHAPSODY	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Oïdium</i> , <i>Manilinia</i> , <i>Stemphylium</i> , <i>Fusicladium</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>
SERENADE BIOFUNGICIDE	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>T. aggressivum f.europae</i> , <i>Botrytis</i>
SERENADE MAX	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>Colletotrichum</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Oïdium</i> , <i>Botrytis</i> , bactérioses
TEXIO		
TEXIO WP	<i>B. subtilis</i> QST 713	<i>Botrytis</i>

5. Implication de *Trichoderma* dans le biocontrôle

5.1. Le genre *Trichoderma*

Trichoderma est un ascomycète qui appartient à la famille des *Hypocreaceae* [195]. Il est omniprésent dans le sol et sur les racines et le bois décomposé de la plante () [196]. C'est un champignon filamenteux qui se reproduit principalement par voie asexuée à travers la formation de conidiophores qui produisent des conidies. Sa croissance est relativement rapide et se caractérise par la formation de colonies blanchâtres qui virent par la suite au vert. Cette couleur est due aux conidies qui se forment avec la maturation de la colonie [195]. *Trichoderma* mène généralement un mode de vie endophyte et se développe sur et dans les racines des plantes, notamment dans l'épiderme et le cortex des racines [197]. Au début des années 1930, l'efficacité de *Trichoderma* comme agent de biocontrôle a été mise en évidence avec la découverte de l'activité antagoniste de *T. lignorum* contre deux pathogènes du genre *Sclerotium* et *Rhizoctonia* [198].

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'espèce *T. harzianum*. Cette espèce est considérée comme modèle pour l'étude de l'activité en biocontrôle [199]. Elle est d'ailleurs connue pour sa capacité à produire un large éventail d'enzymes, utilisées en biocontrôle, mais également pour la dégradation de substrats cellulotiques complexes comme la lignine, ainsi que pour la production de bioéthanol [200,201]. Cette espèce est donc bien exploitée pour son potentiel dans l'agro-industrie.

5.2. Modes d'action dans le biocontrôle

Un grand nombre d'études a reporté l'activité antifongique des souches de *Trichoderma* contre les pathogènes du sol dont *F. oxysporum*, *Sclerotinium* et les pathogènes responsables de certaines maladies de la vigne [202–204]. Comme dans le cas de *Bacillus*, *Trichoderma* possède plusieurs modes d'action différents pour la lutte contre les phytopathogènes fongiques. La première activité antifongique de *Trichoderma*, décrite par Weindling (1934), a été expliquée par sa capacité à parasiter les champignons pathogènes, avec ou sans production de molécules à effet fongicide [198]. Ensuite, plusieurs études ont montré des modes d'action supplémentaires tels que la production de métabolites antifongiques, la compétition avec les pathogènes pour l'espace et les nutriments, la stimulation des défenses des plantes ainsi que la promotion de leur croissance. Ces modes d'action variés sont avantageux dans l'optique de diminuer les risques d'apparition d'une résistance chez les pathogènes, ainsi que le risque de multiplication du nombre d'organismes ciblés. Ces modes d'action sont présentés dans la **Figure 3**.

5.2.1. Mycoparasitisme

Ce terme réfère à l'interaction directe entre *Trichoderma* et le pathogène et se caractérise par la production d'enzymes lytiques par le BCA [205]. Les étapes de ce mécanisme sont schématisées dans la **Figure 9**.

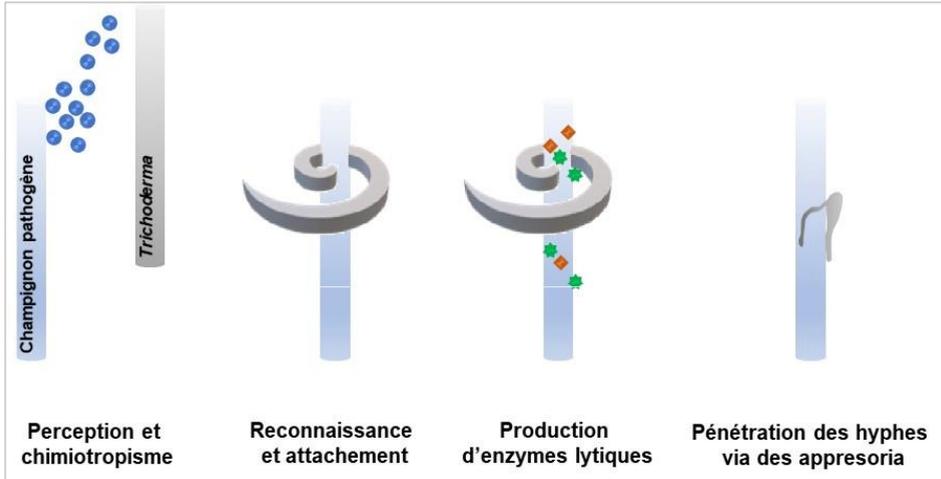


Figure 9 : Les différentes étapes de mycoparasitisme de *Trichoderma* comprenant la perception du pathogène et son rapprochement par chimiotropisme, suivi par la reconnaissance de ce dernier et l'attachement par enroulement autour de ses hyphes, la production d'enzymes lytiques pour dégrader les parois du pathogène et la formation d'appressoria pour y pénétrer

Au cours de ce processus, *Trichoderma* perçoit son rival et l'approche par chimiotropisme en suivant un gradient de sucres ou d'acide aminés produits par ce dernier. Ensuite, une reconnaissance non spécifique s'effectue par une liaison lectine-carbohydre entre les deux champignons [206]. Les hyphes de *Trichoderma* enroulent ceux du pathogène et produisent des enzymes lytiques qui dégradent leur membrane cellulaire. Des appressoria sont alors formés et permettent à *Trichoderma* de pénétrer les hyphes du pathogène. Le développement ultérieur du BCA à l'intérieur du pathogène, tout en épuisant son contenu intracellulaire, entraîne sa mort [207].

Les enzymes lytiques produites sont principalement les chitinases, les glucanases et les protéases, qui ciblent les polysaccharides et les protéines associées à la chitine de la paroi cellulaire des champignons [208]. L'activité de mycoparasitisme a été identifiée chez *T. harzianum* contre *F. proliferatum* et *F. verticillioides* où le taux d'inhibition atteint respectivement 68,38 % et 60,64 % [209]. Des glucanases stables ont été détectées chez une souche de *T. harzianum* dans l'étude de Mustafa *et al.* (2020) et permet de démontrer le potentiel de cette souche dans le cadre du biocontrôle [210]. Ces enzymes hydrolysent la chaîne de polysaccharides de la paroi et la fragilise [208]. Chez *T. harzianum*, il existe 2 β -(1,4)-N-acétylglucosaminidases, 4 endochitinases et une exochitinase qui dégradent la chitine présente dans la paroi des pathogènes fongiques [211]. Quant aux protéases, leur implication dans le mécanisme de mycoparasitisme a été démontrée par la fragilisation des parois de *F. oxysporum* prétraitées avec ces enzymes face aux chitinases et glucanases de *T. harzianum* [212]. La production de ces 2 dernières enzymes est stimulée par les composants de la paroi cellulaire fongique, comme cela a été démontré pour celles de *T. harzianum* contre *Rhizoctonia solani* and *Pythium aphanidermatum* [212].

5.2.2. Antibiose

Ce mécanisme est caractérisé par la production par *Trichoderma* de métabolites secondaires à effet antibiotique [213,214]. Ces métabolites peuvent être classifiés en 3 groupes : les composés volatiles, les composés solubles dans l'eau et les peptaibols [215]. Dans la revue de Vinale *et al.* (2014), la présence de 6 familles de métabolites à effet antifongique a été reportée chez *T. harzianum* [215].

La pyrone 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) possède une activité contre divers pathogènes y compris *R. solani* et *F. oxysporum* sp. *lycopersici*. Elle a été identifiée comme la molécule ayant la plus grande efficacité dans la lutte contre *Alternaria alternata*, *Sclerotium rolfsii* [216]. Elle agit à plusieurs stades de croissance du pathogène : la germination des conidies et le développement du mycélium [217]. Ce métabolite est aussi responsable de la suppression de la production ou de la dégradation de l'acide fusarique produit par *Fusarium moniliforme* [218]. *T. harzianum* produit également des composés azotés hétérocycliques tels que l'harzianopyridone et l'acide harzianique [219,220]. L'harzianopyridone est active à faible dose contre *Leptosphaeria maculans*, *Phytophthora cinnamomi* et *B. cinerea* [221]. Quant à l'acide harzianique, dérivé de l'acide tetramique, il inhibe *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum*, et *R. solani* [222]. Par ailleurs, un autre métabolite, la T22azaphilone, a été mise en évidence en 2006 dans l'extrait du surnageant de *T. harzianum* T22, une souche commerciale utilisée dans les produits de biocontrôle. Ce métabolite inhibe *in vitro* la croissance de *R. solani*, *P. ultimum* et *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [223]. Cette espèce de champignon antagoniste produit aussi de l'harzianolide ainsi que ses dérivés la T39butenolide et la deydroharzianolide [223,224]. L'activité antifongique de ces métabolites a été démontrée contre *G. graminis*, et des souches de *Rhizoctonia* et *Pythium* [223,224]. Une des dernières familles de métabolites secondaires produite par *T. harzianum* est celle des peptaibols. Ce sont des NRPs linéaires ayant une activité antimicrobienne [225,226]. Les peptaibols peuvent agir sur la synthèse de glucane chez les champignons pathogènes. Conséquemment, le pathogène est dans l'impossibilité de régénérer sa paroi cellulaire suite à l'activité des glucanases du BCA [227]. *T. harzianum* produit principalement plusieurs types de peptaibols, comme la trichozine et la trichorzianine, qui présentent plusieurs isoformes [228,229].

En plus de l'inhibition de la croissance des pathogènes, *T. harzianum* est capable de neutraliser certaines toxines produites par ces derniers en sécrétant des enzymes. Les hydrolases, par exemple, dégradent l'aflatoxine et l'ochratoxine produites par *Aspergillus* [230]. Certaines protéases sont aussi impliquées dans la perturbation du mécanisme de pathogénicité de *B. cinerea* en dégradant les enzymes hydrolytiques requises à l'infection de la plante [231].

5.2.3. Compétition pour les nutriments

Trichoderma se développe en colonisant les racines des plantes. Sa vitesse de croissance et sa capacité à se répandre dans le sol en font un bon compétiteur pour l'espace et les nutriments par rapport aux champignons pathogènes. *T. harzianum*

produit des acides organiques qui acidifient le sol et solubilisent les phosphates, le manganèse et le magnésium, microéléments nécessaires à la croissance des microorganismes [214]. Il produit également des sidérophores qui, comme dans le cas de *B. velezensis*, chélatent le fer du sol et y limitent l'accès pour les autres microorganismes [232]. L'acide harzianique, connu pour son activité antifongique, est également un sidérophore solubilisant le fer du sol [233].

5.2.4. Induction des défenses de la plante

L'induction de la RSA et RSI dans la plante a été observée à la suite de l'interaction entre celle-ci et *T. harzianum*. Cette induction permet à la plante d'apporter une réaction plus rapide lorsqu'elle sera attaquée par un pathogène, en amorçant les premières réponses qui suivent l'infection. Par exemple, *T. harzianum* induit l'accumulation de ROS dans les cellules des racines de la vigne, ce qui bloque l'entrée des pathogènes comme *Plasmopara viticola* [234]. En plus, une accumulation plus importante de composés phénoliques et d'enzymes antioxydantes dans les cellules racinaires des plantes traitées par *Trichoderma* a déjà été décrite, conduisant ainsi à une forte activité antioxydante [235]. Ces composés contrôlent le métabolisme des ROS de manière à diminuer les dégâts chez la plante ultérieurement à l'infection par le pathogène. Ce mécanisme est observé notamment chez les tomates et les tournesols traités par *T. harzianum* T22 et NBRI-1055 respectivement [236].

D'un autre côté, et dans un mécanisme similaire à celui de *Bacillus*, le traitement des racines de pommes de terre infectées par *R. solani* avec ce champignon a induit la surexpression des gènes de LOX et PAL entraînant la production de molécules antifongiques [237]. *Trichoderma* modifie aussi l'expression des gènes impliqués dans la défense de la vigne, surtout ceux impliqués dans la voie de l'acide jasmonique et de l'éthylène, augmentant ainsi l'efficacité de la résistance contre *P. viticola*, responsable du mildiou [238]. Il a été démontré que l'harzianolide joue un rôle dans l'induction des gènes des voies de signalisation de l'acide jasmonique et salicylique [239].

Par ailleurs, *T. harzianum* induit l'expression des gènes de la chitinase impliquée dans les mécanismes de défense du palmier [240] et la production de glucanases, peroxydases et cellulases chez le concombre [241]. Cette production est liée au mode de vie de *Trichoderma*, dans l'épiderme et le cortex des racines [197].

5.2.5. Promotion de la croissance de la plante

En parallèle de son activité directe dans le biocontrôle en inhibant les pathogènes et améliorant les défenses de la plante, les champignons du genre *Trichoderma* améliorent la croissance des plantes et le développement des racines. Ce champignon peut modifier les profils hormonaux de la plante, en stimulant la production d'auxine et inhibant celle de l'acide abscissique et de l'éthylène par la production d'ACC désaminase [242,243]. Cette activité est principalement due à la production de COVs [244]. Quand des plants de maïs sont traités avec *T. harzianum* T22, la taille des racines est doublée par rapport aux plantes non traitées [245]. Cette croissance est en

partie due à l'induction des protéines impliquées dans le métabolisme des glucides. En plus de ces protéines, chez le maïs, la production de protéines impliquées dans la photosynthèse est aussi induite, engendrant l'accumulation d'amidon dans la plante. En outre, des surproductions de la fructokinase 2 qui contribue à la croissance des racines et de la tige, de la malate déshydrogénase impliquée dans la fixation du CO₂ pour la photosynthèse, et de l'UDP-glucose déshydrogénase essentielle pour la synthèse des parois cellulaires sont mentionnées [246].

Certaines des molécules antagonistes produites par *T. harzianum* agissent aussi pour promouvoir la croissance des plantes. L'application de 6PP sur le maïs a permis d'augmenter la masse sèche obtenue au niveau des racines et de la tige [247]. De même, l'application de 0,1 ppm d'harzianolide produit par *T. harzianum* SQR-T037 a permis de multiplier le taux de croissance des germes de tomates par 2,5 [239].

La promotion de la croissance est également due à une augmentation de la disponibilité des nutriments pour la plante. Les mécanismes sont les mêmes que ceux intervenant dans la création d'une compétition dans le sol : la production de sidérophores et d'acides organiques. Par exemple, le traitement du concombre avec *T. harzianum* T-203 a augmenté la germination des graines (+30 %), la masse sèche de la plante (+80 %), la longueur des racines (+45 %) et la surface des feuilles (+80 %). Cette croissance significativement plus élevée est corrélée à une plus grande concentration de nutriments mesurée dans la plante : 90 % de phosphore et 30 % de fer en plus [248].

5.3. Produits de biocontrôle commercialisés à base de *Trichoderma*

Les produits de biocontrôle utilisant des souches de *Trichoderma* comme agent actif sont employés pour leur effet fongicide contre divers pathogènes. D'après les listes publiées par (i) la direction générale de l'alimentation, service des actions sanitaires en production primaire en France et (ii) le site web officiel du service public fédéral de la santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement en Belgique, 14 produits sont autorisés à l'application en France et en Belgique. La composition de ces produits ainsi que les pathogènes sur lesquels ils sont actifs sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Les produits de biocontrôle à base de *Trichoderma* sur les marchés français et belge, la souche de *Trichoderma* qu'ils renferment ainsi que le pathogène contre lequel chaque produit est homologué (d'après la direction générale de l'alimentation, service des actions sanitaires en production primaire en France et le site web officiel du service public fédéral de la santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement en Belgique)

Nom du produit	Souche de biocontrôle	Pathogène cible
TRIANUM-P TRIANUM-GR	<i>T. harzianum</i> Rifai T-22	Champignons à la germination, <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
TRIAGRO-GR TRIANUM-G TRIAGRO-WG	<i>T. harzianum</i> Rifai T-22 and ITEM-908	<i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i>
ESQUIVE-WP	<i>T. atroviride</i> I-1237	<i>Botryosphaeria</i> , <i>Eutypa lata</i> , <i>Fomitiporia</i> , <i>Phaeoacremonium</i> , <i>Phaeomoniella</i>
TUSAL	<i>T. atroviride</i> T11 et <i>T. asperellum</i> T25	<i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Phomopsis</i>
XEDAVIR	<i>T. asperellum</i> ICC012 T25 et TV1	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora</i>
TRI-SOIL	<i>T. atroviride</i> I-1237	<i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Botryosphaeria</i> , <i>Eutypa lata</i> , <i>Fomitiporia</i> , <i>Phaeoacremonium</i> , <i>Phaeomoniella</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Sclerotinia</i>
VINTEC	<i>T. atroviride</i> TASC1	<i>Botryosphaeria</i> , <i>Eutypa lata</i> , <i>Fomitiporia</i> , <i>Phaeoacremonium</i> , <i>Phaeomoniella</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Sclerotinia</i>
ASPERELLO T34	<i>T. asperellum</i> T34	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i>
ESCALATOR CASSAT WP BLINDAR	<i>T. asperellum</i> ICC012 <i>T. gamsii</i> ICC080	<i>Botryosphaeria</i> , <i>Eutypa lata</i> , <i>Fomitiporia</i> , <i>Phaeoacremonium</i> , <i>Phaeomoniella</i>

6. Combinaison de BCAs en biocontrôle

Malgré la tendance actuelle du marché du biocontrôle qui est en pleine expansion, la mise sur le marché d'un nouveau produit renfermant des microorganismes n'est pas si évidente. Celle-ci doit tenir compte de la performance des souches sur le terrain, qui dépend de plusieurs facteurs biotiques (l'interaction avec les organismes non-cibles et avec la plante, la colonisation de la rhizosphère...) et abiotiques (l'état du sol, le climat...). Les différentes étapes menant à la mise sur le marché d'un nouveau produit (la production, la formulation, les tests de stabilité et de longévité, les essais aux champs, l'homologation, et la commercialisation) constituent aussi des défis à surmonter. Une alternative à l'homologation de nouveaux produits consiste à combiner plusieurs BCAs existants sur le marché et dont l'efficacité a été déjà démontrée [249].

6.1. Les avantages

L'utilisation de combinaisons de BCAs est une option intéressante en vue d'augmenter l'efficacité de la lutte contre différents pathogènes. Les avantages peuvent se résumer en quelques points essentiels :

- Emploi de plusieurs modes d'action : l'application de BCAs ayant des modes d'action différents permettra un meilleur antagonisme vis-à-vis du pathogène en diversifiant les moyens par lesquels sa croissance est inhibée. Par exemple, la lutte contre *Alternaria alternata* et *Exserohilum rostratum* est plus efficace en appliquant, en combinaison, *T. harzianum* et *B. subtilis*. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ces deux souches agissent via différents mécanismes : compétition pour les nutriments, mycoparasitisme et dégradation des parois cellulaires du pathogène pour *Trichoderma* et production de certains composés antifongiques pour *Bacillus* [250]. L'utilisation d'un consortium dont les espèces qu'il renferme produisent différentes molécules antimicrobiennes est recommandée pour améliorer l'efficacité du biocontrôle [251].
- Elargissement du spectre de pathogènes cibles : chaque BCA est actif contre un nombre déterminé de pathogènes. La combinaison de plusieurs souches ayant chacune une activité contre des pathogènes différents permettra ainsi d'agir, simultanément, sur les diverses cibles des BCAs. Par exemple, le champignon *Paecilomyces lilacinus* est actif contre le nématode *Meloidogyne incognita* alors que *T. harzianum* est actif contre *F. solani*. L'application de *Paecilomyces* et *Trichoderma* sur des plants de papaye infectés par les pathogènes précédents a permis d'obtenir une plus grande efficacité que lorsque les BCAs sont appliqués seul [252].
- Attaque à différents stades de croissance du pathogène : l'action des BCAs sur les pathogènes se produit généralement à un stade particulier de son développement. Par exemple, deux souches de *Pseudomonas* inhibent

respectivement la croissance du mycélium de *Phytophthora infestans* et la libération de spores. Ainsi, l'action des deux souches combinées sur ce pathogène est plus efficace sur la durée que lorsque les souches sont appliquées seule [253].

- Activité dans des conditions abiotiques différentes : l'activité des microorganismes, et ainsi leur efficacité en biocontrôle, dépend des facteurs abiotiques tels que la température et l'humidité qui varient selon la saison, le type de végétation, etc. [254]. Dans l'étude de Guetsky *et al.* (2001), une combinaison entre la levure *Pichia guilhermondii* et la bactérie *B. mycoidea* a été testée contre *Botrytis cinerea*, pathogène de la fraise. Comme la levure est plus efficace dans la suppression de la germination de spores de *B. cinerea* à des températures inférieures à 25 °C, à l'inverse de la bactérie plus efficace à des températures plus élevées, le mélange des deux BCAs permet l'inhibition de la germination de *Botrytis* dans une large gamme de températures et avec une efficacité supérieure à celle observée pour les souches individuelles [255].

Des études concernant l'application de produits de biocontrôle en combinaison avec des pesticides ont aussi été réalisées. Ces combinaisons constituent d'une part une transition progressive vers l'utilisation uniquement de biopesticides, tout en proposant une solution assez intéressante pour le contrôle des phytopathologies. En plus de leur efficacité plus importante dans la lutte contre les pathogènes, les mélanges d'agents chimiques et biologiques permettent de réduire en partie l'application des pesticides et ses impacts, notamment l'apparition de pathogènes résistants aux pesticides. La même efficacité contre *Colletotrichum capsici* et *Leveillula taurica* a été obtenue en appliquant la dose standard d'azoxystrobine ou une dose 2 fois inférieure combinée avec le BCA *P. fluorescens* Pf1 [256]. L'intégration de plusieurs types de traitement permet aussi d'augmenter l'efficacité de chacun d'entre eux. La combinaison de BCAs, de traitement physique et chimique a permis d'améliorer le contrôle post-récolte de *Penicillium* spp., *Monilinia* spp., *B. cinerea* [257].

6.2. Les défis

L'efficacité de la combinaison de plusieurs microorganismes dépend de leur interaction dans le sol. Les souches doivent être compatibles pour que leur antagonisme soit significativement augmenté [258]. Il est fréquent que la combinaison ne soit pas plus performante que l'activité individuelle des souches [259,260].

Premièrement, il est possible que les BCAs présentent un antagonisme l'un contre l'autre. En effet, les modes d'action d'un microorganisme contre le pathogène cible peuvent aussi être actifs contre l'autre microorganisme bénéfique. Ainsi, la croissance du second BCA sera inhibée et son activité dissipée. Dans ce cas, l'activité en biocontrôle de la combinaison ne sera pas avantageuse par rapport à celle des souches individuelles. Dans une étude, 5 produits de biocontrôle ont été testés pour le contrôle

de *B. cinerea*, y compris Trianum (Koppert) et Serenade (Bayer Crop Science), connus comme étant parmi les produits les plus efficaces. L'application simultanée de ces produits n'a pas amené à une meilleure inhibition du pathogène par rapport aux produits appliqués individuellement. Ce résultat peut être expliqué par la présence d'un antagonisme entre ces BCAs quand ils sont ajoutés en combinaison, notamment à cause de la production de molécules antimicrobiennes par *Bacillus* [261].

Deuxièmement, le mode d'application des microorganismes va jouer un rôle déterminant dans le succès de la combinaison. Abeyasinghe (2009) a montré que l'application de *T. harzianum* dans le sol et de *B. subtilis* sur les graines de l'aubergine et du piment permettait de renforcer l'activité antifongique de ces souches contre *R. solani*. Dans le cas inverse, c'est-à-dire quand les graines sont traitées par *Trichoderma* et la bactérie appliquée dans le sol, aucune protection significative contre *Rhizoctonia* n'a été mise en évidence [262]. En plus de la localisation, le moment de l'application peut également affecter l'efficacité des souches. Par exemple, pour la lutte contre le pathogène *R. solani*, les auteurs ont montré que la colonisation des racines de *Poinsettia*, par les souches bénéfiques, *Burkholderia cepacia* et 2 souches de *Rhizoctonia* binucléées, n'est possible que lorsque ces bactéries sont appliquées dans le sol au moment de la plantation. Cette colonisation a été accompagnée d'une induction de la résistance de la plante. Une activité bénéfique a été mise en évidence pour *B. cepacia*, lorsqu'elle est appliquée sur les boutures des racines, grâce notamment à la production d'antibiotiques comme la pyrrolnitrine. Ensuite, différents traitements ont été testés par les auteurs : application simultanée des deux BCAs, application séquentielle et applications multiples. Le meilleur contrôle du pathogène a été obtenu en ajoutant séquentiellement les 2 BCAs : traitement des boutures des racines par *Burkholderia* suivi par l'ajout de *Rhizoctonia* binucléée au moment du repiquage des boutures. Ce mode d'application a engendré une meilleure colonisation des racines par les BCAs, surtout pour les souches de *Rhizoctonia* binucléées, ce qui peut expliquer l'efficacité plus élevée vis-à-vis du pathogène [263].

6.3. Exemples de combinaison de *Bacillus* et *Trichoderma* en biocontrôle

Concernant *Bacillus* et *Trichoderma*, plusieurs études ont confirmé l'efficacité du mélange de ces souches dans la lutte contre des phytopathogènes. Maketon *et al.* (2008) a démontré que lorsque *B. subtilis* AP-01 et *T. harzianum* AP-001 sont inefficaces seuls contre *Ralstonia solanacearum* et *Pythium aphanidermatum*, leur combinaison permet d'inhiber la croissance de ces pathogènes à des niveaux semblables à ceux des pesticides chimiques [264]. De même, la performance *in vivo* de *B. subtilis* B69 dans le biocontrôle de *R. solani* a été améliorée en la combinant avec 4 différentes souches de *Trichoderma* : *T. atroviride* 3A, *T. atroviride* 6, *T. harzianum* SY et *T. harzianum* kmd [265]. Ces combinaisons ont aussi maintenu l'état des semis dont la germination et la croissance ont été renforcées, grâce aux apports plus élevés de nutriments. Ceci a été corrélé avec le taux d'azote dans la plante qui a

été significativement augmenté [266]. Dans une étude similaire, le traitement des graines de pois chiche par *B. subtilis* MF352017 et *T. harzianum* KX523899 a permis de supprimer 93 % du pathogène *F. oxysporum*, entraînant une augmentation de la taille de la plante, des racines et de la masse de la tige et des racines [267].

6.4. Produits de biocontrôle commercialisés combinant *Bacillus* et *Trichoderma*

Malgré l'efficacité remarquable de la combinaison de *Bacillus* et *Trichoderma* dans le biocontrôle vis-à-vis de plusieurs phytopathogènes, aucun produit renfermant ces deux souches n'existe sur les marchés français et belges. Néanmoins, certains produits sont disponibles sur le marché mondial du biocontrôle, ces produits sont présentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Liste des produits de biocontrôle à base de *Bacillus* et *Trichoderma* sur le marché mondial, des souches qu'ils renferment, et du fournisseur associé

Produit	Producteur	Composition
Biohealth TH BS	Humintech	<i>T. harzianum</i> , <i>B. subtilis</i>
Bactolive tuber, Rhizo-Mic Agro Plus	Rhizo-Mic	<i>T. harzianum</i> , <i>Bacillus</i> spp
Lignotiva Plus	Bactiva	<i>Bacillus</i> spp, <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i>
Lentix, Vitix	Koppert	<i>Bacillus</i> spp, <i>Trichoderma</i> spp, champignon mycorhizien
Panoramix Maize, Panoramix Wheat	Koppert	<i>Bacillus</i> spp, <i>Trichoderma</i> spp, <i>Glomus intraradices</i>
Hansebac	Hanseplant	<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i>
SeedSpor	Hanseplant	<i>Bacillus</i> spp, <i>Trichoderma</i> spp, champignon mycorhizien
EKOseedTURF	SPSourcon	<i>Bacillus</i> spp, <i>Trichoderma</i> spp, <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, champignon mycorhizien
Solanova	Intrachem	<i>Bacillus</i> spp, <i>Trichoderma</i> , <i>Pseudomonas</i> , champignon mycorhizien, <i>Streptomyces</i>

7. Etude de la compatibilité des souches

Afin de surmonter les défis que présente l'utilisation simultanée de différents BCAs, il est nécessaire de collecter au préalable les informations relatives à chaque BCA, et notamment leurs conditions optimales de croissance et leur mode d'action en biocontrôle. Ces données permettront d'orienter les recherches afin d'élucider les interactions potentielles entre les microorganismes, pour mettre au point par la suite la meilleure combinaison possible.

Les microorganismes se développent dans le sol en formant des communautés dont les plus simples renferment jusqu'à plusieurs milliers d'espèces différentes [268]. Les différents membres de ce consortium communiquent entre eux, dans l'objectif de coordonner leurs activités au sein de la communauté [269]. La complexité de ces consortia, et leur sensibilité aux facteurs environnementaux, rend l'étude des interactions entre ses membres très problématique. Afin de les décrypter, des communautés synthétiques servant de modèles ont été mis au point afin de permettre de contrôler les paramètres de croissance et ainsi d'étudier les aspects fonctionnels, écologiques et structuraux de l'association des organismes souhaités [270]. Les communautés synthétiques sont générées en cocultivant *in vitro* les espèces d'intérêt dans un milieu défini. Les cocultures sont généralement étudiées sous 2 approches :

- L'approche fonctionnelle dans laquelle la fonction de la coculture est initialement déterminée. La structure, le dynamisme de la population et la stabilité de sa fonction sous différentes conditions sont ensuite traités.
- L'approche interactionnelle qui s'intéresse aux aspects de l'interaction entre les espèces cocultivées, jouant un rôle déterminant dans la structure et le dynamisme de la population.

Dans le cadre de cette seconde approche, il est reporté que l'interaction microbienne est sollicitée par le biais du métabolisme ou par les caractéristiques sociales de la communauté. Ces deux aspects restent quand même liés puisque l'échange de molécules est l'élément principal gouvernant le type d'interaction [270]. Grâce aux récents progrès de la métagénomique, plusieurs modèles mathématiques ont été développés afin de prévoir le dynamisme des microorganismes dans une communauté déterminée. Ces modèles sont généralement basés sur des données génomiques et visent à l'élaboration de modèles métaboliques. Un réseau d'interaction est ainsi élaboré pour prédire le comportement des espèces d'intérêt en présence l'une de l'autre [271,272].

7.1. Les types d'interaction

En considérant que l'interaction peut être neutre, positive ou négative pour les partenaires, 6 types d'interactions sont connus (**Figure 10**) :

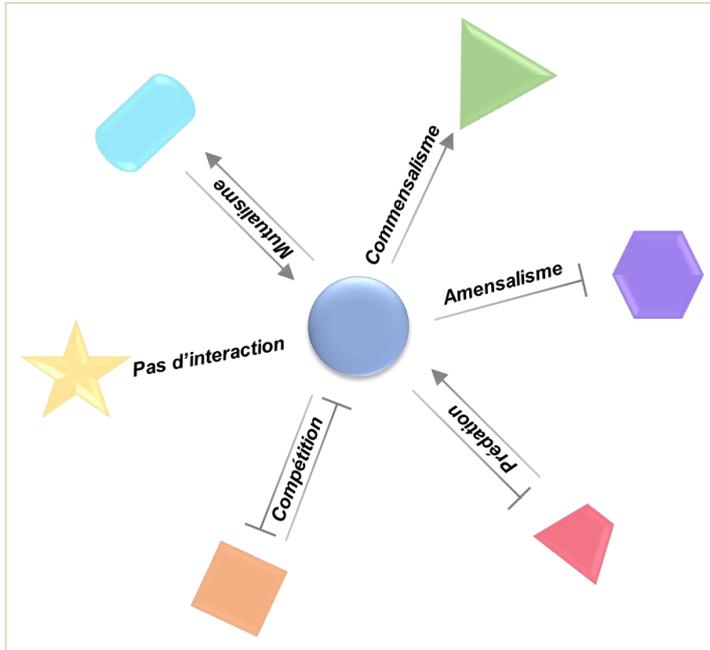


Figure 10 : Les 6 différentes interactions possibles entre les microorganismes (compétition : -/-, prédation : +/-, amensalisme : -/0, commensalisme : +/0, mutualisme : +/+, pas d'interaction : 0/0)

- Le commensalisme : le premier partenaire affecte positivement le second sans qu'il n'en retire de bénéfice ou qu'il soit impacté. C'est le cas notamment pour la majorité des bactéries de la rhizosphère. Ces interactions semblent être essentielles pour maintenir l'équilibre du sol et la préservation de l'état de la plante [273].
- L'amensalisme : c'est l'opposé du commensalisme, où le second partenaire est affecté négativement. Par exemple, dans l'industrie laitière, la croissance de *Pseudomonas* est inhibée par les métabolites produits par *Lactobacillus casei*, dont la croissance et les taux de production de molécules d'intérêt demeurent stables [274].
- La compétition : les deux partenaires s'affrontent pour les nutriments ou l'espace. Ils sont tous les deux affectés négativement au début mais une espèce prend généralement le dessus par la suite. C'est un des modes d'action du BCA *T. harzianum* décrit dans les sections précédentes.

- Le mutualisme : cette interaction est avantageuse pour les deux partenaires. Selon le degré de dépendance des partenaires, le mutualisme peut être obligatoire – obligatoire, obligatoire – facultatif et facultatif – facultatif [275]. Un exemple classique de ce type d'interaction est les champignons endophytes des plantes qui lui confèrent une protection contre les pathogènes (surtout par la stimulation des mécanismes de défense), et en retour, ils épuisent de la matière organique produite par la plante pour se nourrir [276].
- Prédation/parasitisme : un partenaire affaiblit le second en tirant profit de ses ressources en termes de nutrition et d'extension dans l'espace. Dans le cas de la prédation, la « proie » est tuée alors que dans le parasitisme une coexistence des deux organismes est impérative [277].
- Absence d'interaction : les microorganismes ne sont pas affectés par la présence respective de l'autre.

7.2. *Les interactions bactérie-champignon*

La cohabitation des bactéries et des champignons dans le sol et les associations physiques qui en résultent, imposent aux microorganismes d'interagir, ce qui est essentielle pour les divers processus qui existent dans l'environnement [278,279].

Ces interactions s'effectuent par le biais de signaux émis, reçus puis interprétés par les différentes espèces qui y sont réceptives. Plus précisément, la communication intra et inter-espèce s'établit par la production de molécules clés [280]. Leur perception induit des modifications au niveau de l'expression de certains gènes et de la production de métabolites [281]. Ces molécules regroupent généralement des antibiotiques, pouvant être de nature soluble ou volatile, ainsi que des molécules de quorum sensing [282,283]. Elles jouent le rôle d'inhibiteurs de croissance pour les antagonistes ou de promoteurs de croissance pour les symbiontes [284]. Une même molécule peut avoir les deux effets en fonction de la concentration et de l'espèce cible. Par exemple, l'iturine produite par *B. subtilis* C2 induit la formation de spores chez le BCA *T. harzianum* à des faibles concentrations et la lyse de ces mêmes spores à des concentrations plus élevées [285]. Des molécules produites par des souches de *Streptomyces* ont une activité antifongique contre le champignon pathogène *Escovopsis* sp. mais pas contre les basidiomycètes associés aux plantes [286]. Chez les champignons, des récepteurs ont été identifiés pour leur implication dans la perception des bactéries comme les NLRs (Nod-like immune receptor) et les lectines [287,288]. Quant aux COVs, leur perception n'a pas été encore attribuée à des récepteurs, mais surtout à la dépolarisation de la membrane [289].

Dans certains cas, l'interaction bactérie-champignon peut être plus étroite, avec le développement des bactéries attachées sur le mycélium (bactérie fongiphile [290]) ou dans les cellules fongiques (bactéries endofongiques [291]). La communication dans ce type d'interaction dépend également de l'aspect physique de l'adhésion des bactéries au champignon. Cette interaction affecte généralement la croissance, la reproduction et surtout le métabolisme de l'hôte fongique [292,293]. Dans ces types

d'association, les partenaires échangent surtout des nutriments. Leur croissance réciproque peut être entièrement dépendante de cette interaction qui leur permet de procurer des éléments nutritifs récalcitrants, et par la suite coloniser des endroits à la base non adéquats à leur extension [294]. Dans l'interaction entre la bactérie *Candidatus* et le mycorhize à arbuscules *Gigaspora*, la première espèce prélève du carbone, de l'azote et du phosphore à l'hôte et produit des vitamines, des antibiotiques et des molécules de résistance aux toxines. Ainsi, le champignon contribue à la nutrition de la bactérie qui, à son tour, lui permet d'être plus robuste [295]. Les bactéries peuvent aussi se servir du mycélium fongique pour se déplacer. Les hyphes sont capables de s'étendre rapidement et de s'adapter aux conditions physiques et environnementales. En outre ils permettent aussi de solubiliser certains nutriments et d'améliorer les conditions de vie dans le sol (détoxification, régulation du pH), ce qui est favorable au développement de la bactérie [289]. Par exemple, les rhizobia, bactéries fixatrices d'azote très peu mobiles, utilisent le réseau mycélien de *Phomopsis liquidambaris* pour atteindre la rhizosphère des légumes et les approvisionner en azote [296].

7.3. Les aspects coopératifs de l'interaction microbienne in vitro

La collaboration entre les microorganismes s'avère essentielle sur plusieurs plans mis en évidence lors d'études *in vitro*, surtout aux niveaux nutritionnels et de production de métabolites. L'exploitation de ce phénomène permet notamment d'améliorer la biotransformation de substrats dans des domaines tels que le traitement des eaux, la bioremédiation et la synthèse de bioproduits [297]. En effet, certaines fonctions accomplies par les microorganismes interagissant ensemble ne sont pas détectées lorsque les microorganismes sont cultivés individuellement, ou alors sont observées dans une moindre ampleur [298].

7.3.1. Comblement des déficits nutritionnels

Parfois, les conditions de culture en laboratoire peuvent imposer une dépendance nutritionnelle entre les espèces. Dans certains cas, un cross-feeding lié au substrat est observé. Dans une coculture de 2 microorganismes, ce terme signifie qu'une seule espèce est capable de consommer le substrat qui sera utilisé pour produire des métabolites qui serviront à la croissance de la deuxième espèce. Cette dernière est alors incapable de se développer en monoculture dans les mêmes conditions [299]. Ce phénomène a été observé dans le cas de 3 bactéries qui dégradent synergiquement la lignocellulose : *Clostridium thermocellum*, *C. stercorarium* et *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*. Parmi ces 3 bactéries, deux sont incapables de se développer individuellement dans un milieu défini présentant un déficit en nutriments complexes. Cette difficulté à se reproduire a été comblée par une coculture avec la troisième bactérie, qui est capable de se reproduire dans ce milieu. Cette bactérie semble approvisionner les deux autres avec des composés qu'elle produit suite à la dégradation du substrat [300].

Quand le cross-feeding lié au substrat est essentiel pour la croissance des microorganismes dans un milieu particulier, cette inter-dépendance peut permettre de remodeler le type d'interaction microbienne [301]. En d'autres termes, deux microorganismes non compatibles peuvent coexister sans compétition si la croissance de l'un est dépendante de l'autre pour des raisons nutritives [302]. Cette compatibilité peut alors être supprimée en supplémentant la culture par l'élément nutritif manquant [303]. En effet, la disponibilité des nutriments joue un rôle prépondérant dans l'orientation de l'interaction qui peut alors varier d'une interaction de type mutualiste à une compétition voir à un parasitisme. Hoek *et al.* (2016) ont étudié le changement de type d'interaction en utilisant deux levures de *Saccharomyces cerevisiae* modifiées génétiquement pour créer un cross-feeding : la première souche ne produit pas la leucine mais surproduit le tryptophane et inversement pour la seconde. Ainsi, en monoculture, ces souches ont respectivement besoin de 32 μM de leucine et 2 μM de tryptophane pour se développer. En coculture et avec des concentrations d'acides aminés plus faibles que celles requises en monoculture, un mutualisme s'établit entre les levures. Toutefois, l'augmentation de l'apport extérieur en leucine a engendré un amensalisme, dans lequel la souche auxotrophe à la leucine se développe normalement alors que la croissance de la levure auxotrophe au tryptophane est négativement impactée [304].

7.3.1.1 Nutrition en azote des microorganismes

La croissance des microorganismes requiert la disponibilité de plusieurs éléments nutritifs et en particulier le carbone, l'azote, le phosphore et l'oxygène pour les microorganismes aérobiques. Ces nutriments sont essentiels pour la croissance, la reproduction et la production de métabolites [305]. En particulier, l'azote est utilisé pour la production d'acides nucléiques et d'acides aminés, formant ainsi le 4^{ème} élément le plus abondant dans la cellule [306,307]. La source principale d'azote est l'air atmosphérique qui renferme l'azote sous forme de gaz inerte N_2 . L'activité microbienne est le principal moteur de conversion du N_2 en ses formes inorganiques (le nitrate, le nitrite, l'ammonium et l'ammoniaque) et organiques (les acides aminés, les vitamines, les lysats de protéines). Les microorganismes présentent souvent une préférence pour l'une ou l'autre des formes d'azote pour leur nutrition. Les formes organiques contiennent aussi des facteurs de croissance, ce qui explique la tendance des microorganismes à consommer ces sources en priorité.

Dans le sol, l'azote se trouve généralement sous ses différentes formes minérales (les formes organiques sont apportées surtout par les plantes sous formes d'exsudats ou de matières décomposées). Les réactions contrôlant les transformations respectives de ces formes constituent le cycle d'azote qui comprend 4 phases principales : l'ammonification, la nitrification, la dénitrification et l'anammox [307].

- L'ammonification conduit à la production d'ammonium. Celle-ci est possible via la fixation du N_2 atmosphérique (essentiellement par des bactéries) ou via la réduction du nitrate en nitrite puis en ammonium (par les bactéries et les champignons).

- La nitrification génère le nitrate comme produit final. L'ammonium est oxydé en nitrate en une ou 2 étapes avec le nitrite comme produit intermédiaire.
- La dénitrification fait intervenir la respiration anaérobie du nitrate, nitrite, oxyde nitrique et nitreux pour former du N₂.
- L'anammox, ou oxydation anaérobie de l'ammonium, mène à la production de N₂ avec l'oxyde nitrique et l'hydrazine comme intermédiaires.

7.3.1.2 Assimilation de l'azote sous forme de nitrate

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons aux réactions d'ammonification du nitrate par le processus de réduction. Deux voies sont possibles : la réduction assimilatoire du nitrate et la réduction dissimilaire du nitrate (**Figure 11**).

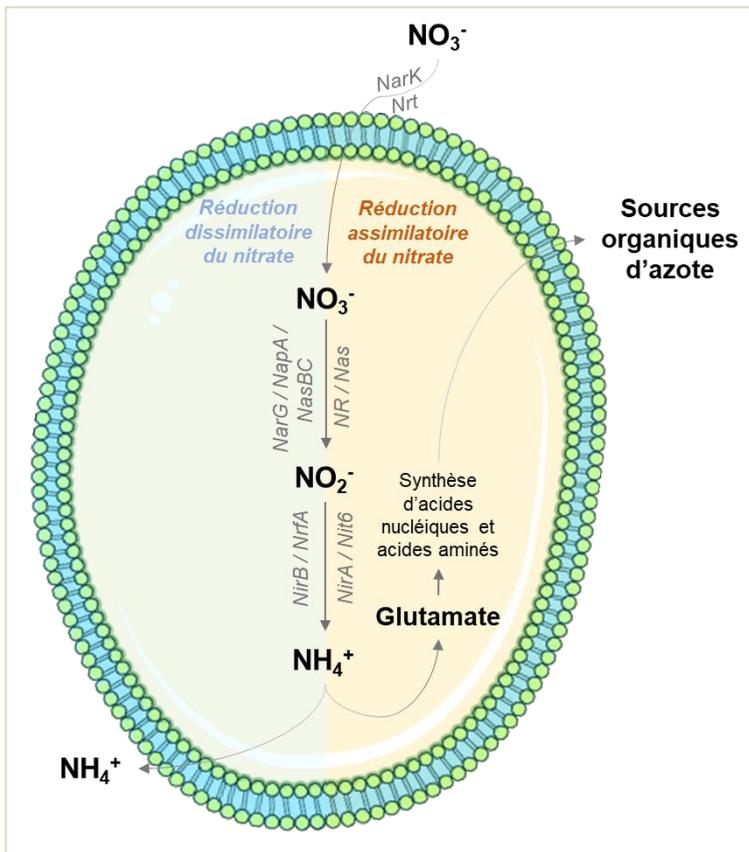


Figure 11 : Utilisation du nitrate extracellulaire par voie dissimilaire (le nitrate est réduit en nitrite puis en ammonium sécrété) et assimilatoire (le nitrate est réduit en nitrite puis en ammonium qui servira à la synthèse du glutamate). L'azote présent sur le glutamate servira ensuite à la synthèse d'autres molécules azotées tels que d'autres acides aminés et les acides nucléiques qui pourront éventuellement être excrétés dans le milieu extracellulaire.

Les deux voies nécessitent un transport préalable du nitrate dans le cytoplasme, le siège principal des réactions de réduction. Pour assurer ce transport, plusieurs familles de transporteurs existent telles que les NarK chez les bactéries et les Nrt chez les champignons [308,309].

La voie assimilatoire du nitrate implique la réduction du nitrate intra et extra cellulaire en ammonium, qui est ensuite utilisé dans la synthèse d'acides nucléiques et de protéines pour la production de biomasse. Deux enzymes sont impliquées dans cette réaction : la nitrate réductase (NR / Nas) et la nitrite réductase (NirA / Nit6) qui réduisent successivement le nitrate en nitrite puis en ammonium [310]. Par l'action des glutamate déshydrogénase et glutamine synthétase / glutamate synthase impliquées dans le métabolisme du glutamate, l'ammonium est intégré dans les composés organiques synthétisés par la cellule [311]. L'assimilation du nitrate est très répandue chez les bactéries et les champignons [312]. Les gènes codants pour les nitrate et nitrite réductases ont été identifiés chez *B. megaterium* et *Aspergillus nidulans*, deux espèces capables d'utiliser le nitrate comme unique source d'azote [313,314]. Malgré cette capacité à assimiler le nitrate, les microorganismes préfèrent l'utilisation de l'ammonium lorsque cette source est présente dans l'environnement. Des études ont montré que lorsque l'azote est disponible sous forme de nitrate et d'ammonium, les microorganismes consomment cette dernière forme de manière préférentielle, ce qui permet en général une meilleure croissance des bactéries et champignons [315,316]. En effet, l'ammonium inhibe la production des réductases des nitrates et nitrites afin d'économiser l'énergie dédiée aux mécanismes de production de ces enzymes et de la réduction du nitrate [317,318].

Dans la voie dissimilatoire, le nitrate joue le rôle d'un accepteur d'électron, en absence d'oxygène, et sert à la respiration anaérobique. La première étape consistant à réduire le nitrate en nitrite est réalisée par une protéine membranaire (NarG), périplasmique (NapA) ou cytoplasmique (NasBC). Ensuite, le nitrite est réduit en ammonium par une nitrite réductase cytoplasmique (NirB) ou périplasmique (NrfA), dont les opérons sont induits en fonction de la concentration de nitrate dans l'environnement [306,319]. L'ammonium produit est sécrété et n'est pas utilisé directement dans les voies de biosynthèse [320]. Cette voie est largement exploitée par les bactéries. Son existence a été reportée chez quelques souches de *Bacillus* comme *B. paralicheniformis*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* [321–323]. Chez cette dernière bactérie qualifiée d'anaérobie facultative, l'ammonium du milieu de culture est consommé et permet le développement de la bactérie ainsi que la production de biosurfactant et de nitrate. Le nitrate produit est ensuite utilisé pour la respiration quand l'oxygène est consommé [305]. Cette voie est moins répandue chez les champignons. Des ascomycètes comme *F. oxysporum* et *A. nidulans* parviennent à produire de l'ammonium à partir du nitrate par la voie dissimilatoire, mais en général la réduction s'arrête à l'étape de la production du nitrite [320]. Bien que ce mécanisme survienne généralement en conditions anaérobies [324], une étude récente a pu démontrer son occurrence chez une souche de *Pseudomonas* en aérobie [325].

Le potentiel différé des microorganismes à assimiler le nitrate comme unique source d'azote peut être exploité afin de créer un cross-feeding entre deux espèces parmi lesquelles une seule est capable de l'assimiler.

7.3.2. Amélioration de la production

Un autre aspect très intéressant qui découle des interactions microbiennes est l'induction de la production de métabolites d'intérêt. L'évolution de la génétique et des techniques de séquençage ont permis de détecter chez les bactéries et les champignons, un grand nombre de gènes non exprimés, dit gènes silencieux, codant pour des métabolites secondaires potentiellement exploitables dans le domaine de la pharmacutique et du biocontrôle [326,327]. La non-expression de ces gènes est principalement attribuée aux conditions de culture en laboratoire, qui sont trop éloignées des conditions observées dans l'environnement naturel de la souche. La coculture de différents microorganismes est un moyen de contourner ce défi puisqu'elle permet de se rapprocher des conditions observées dans la nature où les microorganismes se développent sous forme de communautés. Des études ont montré l'induction de la production de métabolites secondaires en coculture, faisant ainsi de cette méthode de culture une approche intéressante pour l'obtention de nouveaux composés naturels [328]. En effet, l'interaction bactérie-champignon peut influencer sur l'activité de biocontrôle des microorganismes en agissant sur leur métabolisme. Cette activité est par exemple accrue dans le cas de combinaison de *T. atroviride* et *P. fluorescens* par rapport aux monocultures grâce à la production de COVs par le champignon. Ces métabolites perçus par la bactérie, induisent la surexpression du gène *phlA* et conséquemment la production du 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), un antibiotique impliqué dans l'activité de biocontrôle de cette souche. De son côté, *Trichoderma* réagit à la perception du DAPG en surexprimant le gène *nagl* et la production de N-acétyl- β -D-glucosaminidase, une enzyme impliquée dans l'activité chitinolytique de *Trichoderma* [329]. Dans un contexte similaire, la croissance de *Serendipita indica*, un champignon endophyte bénéfique à la plante, est stimulée en présence des bactéries endophytes appartenant aux genres *Methylobacterium*, *Tardiphaga*, *Rhodanobacter* et *Trinickia*. Cette stimulation de croissance a constitué un élément déterminant dans l'amélioration de la lutte contre les pathogènes *R. solani* et *F. oxysporum* [330].

7.4. Les cocultures comme système d'étude des interactions

Plusieurs méthodes ont été développées dans le but de mimer les conditions dans lesquelles ces organismes se trouvent dans leur habitat originel. Une des méthodes les plus efficaces consiste à les cultiver en présence d'autres microorganismes ou des composés qu'ils produisent [331].

7.4.1. Les différentes techniques de coculture

Sur un milieu solide, et plus précisément sur des boîtes de Pétri, les cocultures interviennent souvent lors de tests d'antagonismes où les diverses espèces sont placées séparément ou non sur le milieu de culture. Ce genre de coculture permet de

déterminer le type d'interaction selon le profil de développement des souches surtout quand les microorganismes sont placés à des endroits différents, 4 comportements sont possibles [332] (**Figure 12**) :

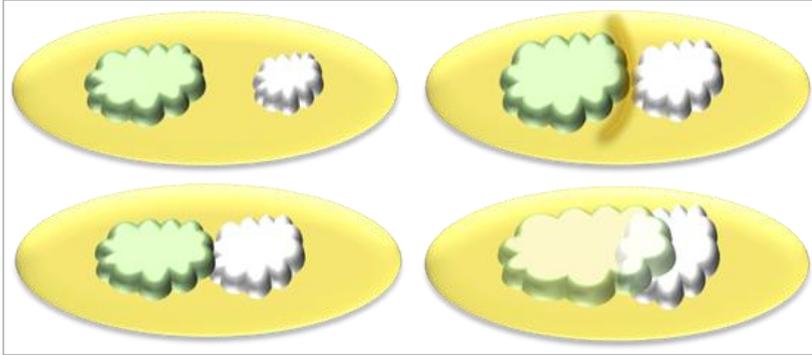


Figure 12 : Les différentes morphologies d'interaction distinguées sur boîte (zone d'inhibition, ligne d'inhibition, contact d'inhibition et surcroissance) (d'après Bertrand *et al.*, 2014)

- Une zone d'inhibition dans laquelle aucun microorganisme se développe
- Une ligne d'inhibition entre les colonies, généralement due à la production de métabolites
- Un contact d'inhibition entre les colonies qui entrent en contact, puis arrêtent de se développer
- Une surcroissance d'une des espèces qui s'étend sur l'autre colonie

Pour les interactions champignon-bactérie, un système de microfluidique a été développé. Celui-ci présente des canaux parallèles ouvert vers l'extérieur par lesquels pénètre le mycélium fongique qui pousse sur un morceau de milieu gélosé. De l'autre côté, la bactérie est inoculée et le développement du champignon vers elle est observé microscopiquement [333] (**Figure 13**).

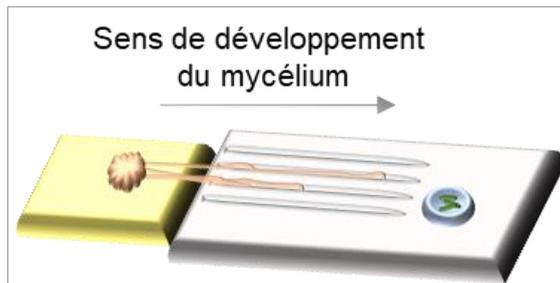


Figure 13 : Système de microfluidique permettant l'étude de l'interaction entre les champignons filamenteux et les bactéries par la croissance du mycélium dans des canaux parallèles amenant à la bactérie (d'après Stanley *et al.*, 2014)

Cette technique a permis notamment d'élucider le mode d'action de *B. subtilis* sur les hyphes de *Coprinopsis cinerea*.

Dans les cocultures liquides, deux modes de culture peuvent être discernés : mixtes ou séparées. Dans le premier type, les microorganismes sont libres dans le milieu de culture et se développent ensemble dans le même environnement. Ce genre de culture est exploité lorsque les microorganismes cultivés sont taxonomiquement proches ou que le milieu de culture est riche. La coculture mixte de microorganismes différents requiert une adaptation du milieu de culture [334]. Ce système est notamment utilisé pour des expériences utilisant des récipients dédiés aux cultures de microorganismes tels que les fioles ou les bioréacteurs [335]. Grâce à ce système de coculture, Ola *et al.* (2013) ont pu observer une augmentation de la production de métabolites produits par *Fusarium tricinctum* et *B. subtilis* avec une production 78 fois supérieure à celles observées pour les monocultures [336].

Dans une variante de coculture liquide, les microorganismes peuvent être séparés physiquement afin de mieux contrôler le système. Cette méthode n'est intéressante que lorsque les différents composants de la coculture échangent des substrats ou des métabolites [337]. Plusieurs systèmes permettent de maintenir une séparation physique entre les microorganismes cocultivés. Une première option consiste à immobiliser au moins l'un des microorganismes sur un support. Dans l'industrie de production du méthanol, l'encapsulation des souches de *Methylomonas methanica* et *Methylocella tundrae* dans des billes en alginate de sodium a permis d'augmenter les taux de production de cet alcool en comparaison avec les cellules libres [338]. L'utilisation de microfluidique permet aussi une séparation des microorganismes. Cette technique est employée à l'échelle unicellulaire. Les cellules sont séparées par des microcanaux, des membranes ou en les déposant en gouttelettes (encapsulation par la technique d'émulsion), et leur interaction est évaluée quantitativement. Les conditions de culture sont alors facilement contrôlables [339] (**Figure 14A**).

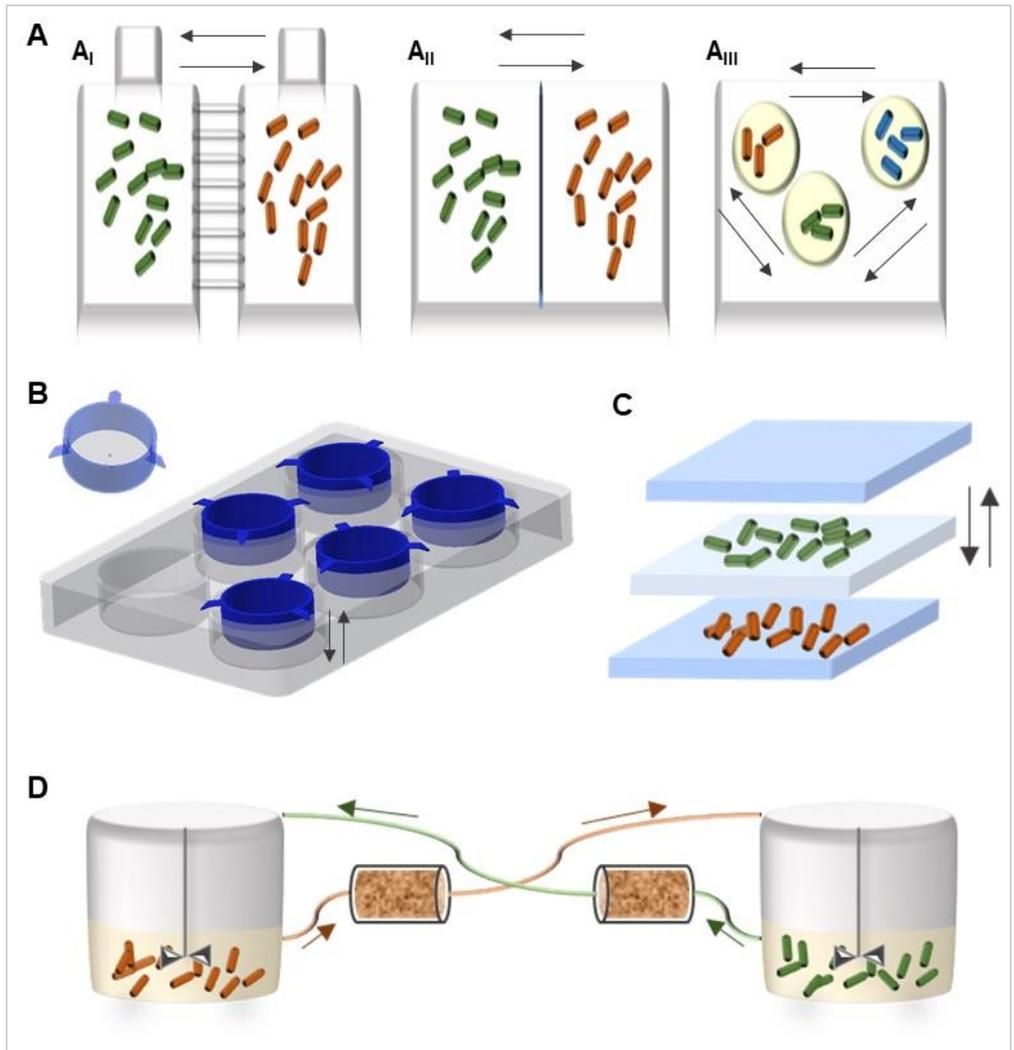


Figure 14 : (A) Différents systèmes pour étudier l'interaction microbienne avec séparation des microorganismes en (A) microfluidiques (A_I) par des microcanaux, (A_{II}) une membrane, ou (A_{III}) des gouttelettes correspondantes à une émulsion, (B) en microplaque avec des inserts contenant une membrane, et en bioréacteurs par des membranes variés : (C) en polycarbonate permettant la diffusion des molécules volatiles et (D) membrane de microfiltration. Les flèches indiquent le sens d'échange de molécules (figures adaptées respectivement de Zheng *et al.*, (2012), Heyse *et al.*, (2019), Salerno *et al.* (2018), Taniguchi et Tanaka (2004)).

L'utilisation des membranes est une des techniques les plus utilisées pour garantir une séparation totale des cellules appartenant aux différentes espèces. Ces membranes sont poreuses, ce qui permet la diffusion des molécules, mais pas des cellules. Ainsi, les différentes espèces communiquent et interagissent par le biais des métabolites

qu'elles produisent sans avoir de contact physique. Ce système de coculture a été employé par Heyse *et al.* (2019) dans son étude sur l'effet de l'interaction sur l'hétérogénéité phénotypique bactérienne, qui est influencée par les conditions environnementales [340]. Des inserts comprenant une membrane ont été placés dans des puits de microplaques puis les bactéries ont été inoculées séparément dans les 2 compartiments (**Figure 14B**). A une plus grande échelle, il existe des bioréacteurs avec des membranes de séparation, comme par exemple un bioréacteur divisé en deux compartiments par une membrane en polycarbonate permettant d'étudier l'effet des molécules diffusables entre différents types de cellules humaines sans interaction physique [341] (**Figure 14C**). Dans une autre variante, deux bioréacteurs contenant chacun un microorganisme différent peuvent être connectés via des membranes de microfiltration qui permettent la circulation uniquement du surnageant de chaque culture entre les 2 unités de part et d'autre de la membrane [342] (**Figure 14D**).

7.4.2. Les défis

Quand des microorganismes appartenant à des espèces différentes et surtout à des domaines taxonomiques différents sont cocultivés, le défi majeur consiste à maintenir leur coexistence. Pour pouvoir retirer un bénéfice de la coculture (par exemple la production de molécules d'intérêt), tous les microorganismes doivent se développer. Leur croissance et coexistence ne sont pas systématiques, surtout s'ils présentent des vitesses de croissance très différentes. Dans ce cas, la souche se développant plus rapidement prend le dessus en épuisant les nutriments disponibles et réprime la croissance des autres souches. Ce problème peut être réglé en jouant sur certaines conditions de culture telles que la source de carbone, la température d'incubation et le pH [343].

Un second problème constaté pendant la coculture est la reproductibilité des études. La stabilité des cocultures est très dépendante de facteurs extérieurs. La moindre perturbation ou changement des conditions peut affecter le dynamisme des microorganismes, ce qui rend la reproductibilité des résultats très faible. Le choix des concentrations respectives des microorganismes à inoculer est un facteur essentiel dans le maintien de la stabilité de la coculture. En effet, le ratio d'inoculation permet de déterminer la tendance de l'évolution de la coculture en influant sur la taille des sous-populations présentes [343].

7.4.3. Les cocultures *Bacillus* – *Trichoderma*

Actuellement, quelques études ont été menées concernant les cocultures de différentes espèces de *Bacillus* et *Trichoderma*. Ces études décrivent l'aspect technique de la coculture, son effet sur certains caractères des souches par une approche transcriptionnelle, la production de molécules d'intérêt et l'efficacité en biocontrôle. Dans cette section, une analyse approfondie des études les plus pertinentes sera faite afin de dresser un état de l'art exhaustif des informations disponibles jusqu'à ce jour sur les interactions *in vitro* de *Bacillus* et *Trichoderma*.

Dans la première étude de Wu *et al.* (2018) les auteurs ont cocultivé *B. amyloliquefaciens* ACCC11060 et *T. asperellum* GDFS1009 dans le milieu BP (0,3

% (p/v) extrait de bœuf, 0,5 % (p/v) peptone) à partir des précultures respectives. L'inoculation est effectuée avec 2 ratios bactérie : champignon différents, 1 : 1 et 1,9 : 1. Après 3 jours, l'aspect des différentes cultures est décrit, les métabolites dans les surnageants analysés et l'efficacité dans le biocontrôle détectée. Lorsque les souches sont inoculées au ratio 1 : 1, le champignon semble dominer tout en restant à des concentrations inférieures à celle de la monoculture. Pour le ratio 1,9 : 1, la culture ressemble davantage à la monoculture de *Bacillus* avec une raréfaction du champignon. En ce qui concerne la production de métabolites, une différence significative a été décelée entre les monocultures de *Bacillus* et *Trichoderma* et la coculture avec le ratio 1 : 1 mais pas entre la monoculture de bactérie et la coculture au ratio 1,9 : 1. Dix métabolites à effet antimicrobien contre *F. solani* et *Staphylococcus aureus* par exemple, sont surproduits dans les cocultures. Dans la coculture avec les ratios 1,9 : 1, cette surproduction est accompagnée d'une meilleure efficacité dans le biocontrôle de *B. cinerea*. En plus des molécules antimicrobiennes, la production de certains acides aminés, dont des acides aminés rares comme l'allothréonine, est induite [344].

Une seconde étude menée par la même équipe avait pour objectif d'optimiser le milieu de coculture de *B. amyloliquefaciens* 1841 et *T. asperellum* GDFS1009, ainsi que les conditions d'inoculation afin d'améliorer l'efficacité de ces deux souches combinées dans le biocontrôle. Parmi les milieux de culture, le TY (1 % (p/v) tryptone, 0,5 % (p/v) extrait de levure, 0,5 % (p/v) NaCl), le NB (1 % (p/v) peptone, 1 % (p/v) extrait de bœuf, 0,5 % (p/v) NaCl) et l'YMC (2 % (p/v) extrait de levure, 1 % (p/v) molasse, 1 % (p/v) farine de gluten de maïs) sont utilisés. L'inoculation des cocultures est faite à partir d'une préculture de *Bacillus* et une préculture de *Trichoderma* de différents âges : 0, 24 et 48 h. Pour tous les milieux testés, l'inoculation de *Trichoderma* sans préculture avec *Bacillus* a engendré l'inhibition de la croissance du champignon. L'inoculation séquentielle s'est démontrée plus efficace surtout lorsque *Trichoderma* est préalablement cultivé 48 h. Le milieu YMC, dans lequel la croissance est la plus importante, a été optimisé en termes de concentration de substrats par un modèle mathématique, puis validé expérimentalement. Dans les conditions optimales, l'expression de certains gènes et la production de métabolites chez les deux souches, ainsi que les activités enzymatiques et antagonistes ont été analysés. Par rapport à la monoculture, les gènes impliqués dans la sporulation de *Trichoderma*, le métabolisme secondaire, la production d'enzymes et d'antioxydants (à effet antagoniste et promoteur de croissance de la plante) sont surexprimés. Toutefois, les gènes codant pour la macrolactine et la difficidine chez *Bacillus* sont sous-exprimés en coculture. La production de 68 métabolites est significativement plus élevée en coculture qu'en monoculture, y compris les enzymes à activité chitinolytique. Ces résultats se traduisent par une activité antagoniste plus élevée du surnageant de la coculture contre *F. oxysporum*, *F. graminearum* et *B. cinerea*, ainsi qu'une meilleure germination et croissance des graines de blé en présence des 2 microorganismes bénéfiques [345].

Suite à la mise en évidence de l'aspect bénéfique de l'inoculation séquentielle sur la croissance de *Bacillus* et *Trichoderma* en coculture, l'effet du temps qui sépare l'inoculation des deux microorganismes sur l'expression des gènes impliqués dans leurs mécanismes de biocontrôle a été étudié. Chez *Trichoderma*, l'expression des mêmes gènes que ceux décrits dans le cadre de l'étude précédente, est modulée selon le type d'inoculation. Elle est régulée négativement en co-inoculation et positivement en inoculation séquentielle. L'expression des gènes de la macrolactine et la difficidine de *Bacillus* suit une tendance opposée. La production de métabolites par *Bacillus* est induite en coculture avec co-inoculation et ceux produits par *Trichoderma* en coculture avec inoculation séquentielle, entraînant une plus forte activité chitinolytique. Par conséquent, le surnageant de la coculture avec inoculation séquentielle s'est avéré plus efficace dans le contrôle *in vitro* et *in vivo* de *F. graminearum*. Les graines de maïs traitées par les différentes cultures de microorganismes ont montré une meilleure germination avec la coculture, indépendamment de la méthode d'inoculation [346]. Les mêmes auteurs ont également mis en évidence une compétition entre les deux souches quelle que soit la méthode d'inoculation. L'interaction entre ces deux souches, *T. atroviride* et *B. amyloliquefaciens*, est en partie régulée par le gène *Vell*, qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans la sporulation et la production de métabolites secondaires ainsi que les enzymes de dégradation des parois cellulaires par *Trichoderma*. Des tests utilisant une souche mutée pour ce gène ont montré que son expression est induite lors d'une coculture avec *Bacillus*. Cependant, la production de macrolactine et difficidine par cette bactérie a été réduite via l'expression de ce gène par *Trichoderma*. Ceci constitue un premier rapport de l'implication de régulateurs génétiques dans l'interaction *Trichoderma* – *Bacillus* [347].

Dans une étude similaire, une optimisation des conditions de cocultures de *T. atroviride* SG3403 et *B. subtilis* 22 dans le YMC (concentration des substrats, vitesse d'agitation, température, pH) a été effectuée par Li *et al.* (2020) en utilisant des modèles mathématiques. Après avoir déterminé ces conditions, le surnageant de cette coculture a démontré une efficacité plus élevée vis-à-vis de l'inhibition de *F. graminearum*, due à la production d'un plus grand nombre de molécules ayant une activité antifongique [348].

La compatibilité de deux autres souches de microorganismes, *T. virens* GI006 et *B. velezensis* BS006, impliquées dans le biocontrôle de *F. oxysporum* sur la groseille, a été étudiée par Izquierdo-Garcia *et al.* (2020). D'abord, l'effet du surnageant de chaque souche sur la croissance de l'autre a été déterminé en supplémentant le milieu de culture avec différentes concentrations de surnageant. La croissance des deux microorganismes ainsi que leur activité antagoniste ne sont pas affectées par la présence des métabolites produits par l'autre. La croissance de *Bacillus* est toutefois retardée dans ces conditions. Par la suite, les microorganismes sont exposés pendant plusieurs heures à différentes concentrations de surnageant issus de la culture de l'autre souche. Aucun effet négatif n'a été détecté sur la germination des spores de *Trichoderma*. En revanche, à de fortes concentrations de surnageant de ce dernier et

pour une exposition de 24 h, la capacité de *Bacillus* à former des biofilms est altérée. Ce même résultat a été observé en cocultivant la bactérie en présence de quantités élevées du champignon. Des cocultures sur boîte de ces deux souches ont permis de montrer une inhibition de la croissance du champignon par la bactérie sur les milieux synthétiques LB et PDA (Lysogeny Broth et Potato Dextrose Agar respectivement) et les milieux contenant des exsudats racinaires ainsi que des solutions de sol synthétiques. Quand le milieu utilisé se rapproche de la composition du sol (exsudats racinaires de la groseille avec ou sans solution de sol naturel), aucune inhibition de *Trichoderma* par *Bacillus* n'est relevée. En effet, la bactérie est incapable de se développer sur ces milieux. Sur les LB et PDA, l'interaction entre ces deux BCAs est neutre en terme d'activité de biocontrôle puisque l'inhibition de *Fusarium* est similaire quand ils sont utilisés seuls ou en combinaison. De même, dans les milieux contenant les exsudats racinaires artificiels, avec ou sans solution de sol, aucune activité synergique entre *Bacillus* et *Trichoderma* n'est observée [349].

Par ailleurs, une étude sur la compatibilité entre *Trichoderma* et *Bacillus* a été menée dans la dissertation de Silva Guachamín, et a démontré qu'en combinant des souches de *Trichoderma* avec des souches de *Bacillus* ayant une capacité d'antagonisme estimée à plus de 70 %, la croissance de *Trichoderma* est inhibée. Lorsque la capacité d'antagonisme de *Bacillus* est plus faible (40 à 50 %), une compatibilité peut être établie entre certaines souches de ces champignons et bactéries [350].

Pour résumer, ces études ont montré que la coculture de *Bacillus* et *Trichoderma* avec une co-inoculation défavorise la croissance du champignon, notamment à cause de l'activité antagoniste de *Bacillus* et de son rythme de croissance rapide. La variation des conditions physicochimiques ainsi que le milieu de culture et la méthode d'inoculation jouent un rôle dans l'orientation de l'interaction entre ces microorganismes. La modulation de ces variantes constitue alors une piste intéressante pour optimiser la production de métabolites antibactériens impliqués dans la lutte biologique des phytopathogènes. Dans les études citées, une compétition entre *Bacillus* et *Trichoderma* est toujours reportée, bien que le contrôle des pathogènes semble être plus efficace en combinant ces deux souches plutôt qu'en les utilisant chacune de manière indépendante.

8. Objectifs

L'étude bibliographique proposée dans cette thèse a permis de démontrer l'importance et la complémentarité des genres *Bacillus* et *Trichoderma* pour le biocontrôle des maladies des plantes. L'objectif principal de ce travail est de caractériser le comportement des deux souches en cocultures dans l'optique de développer un nouveau produit contenant ces deux microorganismes.

Dans un premier temps, l'activité potentiellement antagoniste de *B. velezensis* GA1 vis-à-vis de *T. harzianum* IHEM5437 sera vérifiée et le rôle joué par les lipopeptides produits par *B. velezensis* GA1 dans cette activité antagoniste sera caractérisé. Par la suite, différentes approches de culture seront développées afin de définir des conditions rendant une coculture de ces deux souches possible :

- Dispositifs combinant la culture planctonique et la culture en biofilm sur support,
- Ensemencement simultané ou différé des deux souches,
- Utilisation de milieu de culture induisant une dépendance nutritionnelle entre les deux souches.

L'impact de ces différentes approches sur l'expression des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse des lipopeptides et sur la production des lipopeptides eux-mêmes sera défini.

Les résultats obtenus pourraient conduire au développement d'un produit de biocontrôle combinant des BCAs des genres *Bacillus* et *Trichoderma* et présentant une efficacité potentiellement supérieure à celle des produits qui existent déjà sur le marché mondial. Ce produit sera original sur les marchés français et belges, où ce type de formulation n'est pas encore proposé.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

1. Souches

Différentes souches de *Bacillus* et *Trichoderma* ont été utilisées dans le cadre de ce projet de thèse. Toutefois, les deux souches principales autour desquelles les analyses d'interactions ont été effectuées sont *Bacillus velezensis* GA1 et *Trichoderma harzianum* IHEM5437. La première souche, initialement nommée *B. amyloliquefaciens* GA1 a été isolée à partir de fraisiers italiens par le Laboratorio Vitrocoop Cesana et identifiée par Arguelles-Arias *et al.* (2009) [120]. Quant au champignon *T. harzianum*, il a été fourni par le laboratoire du professeur Bruno Cammue de l'Université de Louvain.

Des mutants de *B. velezensis* GA1, mutés au niveau des gènes codant les synthétases de lipopeptides, ainsi que d'autres espèces et souches de *Bacillus* et *Trichoderma* ont servi à approfondir l'étude de l'interaction entre les deux souches de base. Différents phytopathogènes ont aussi été utilisés pour tester l'efficacité de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le biocontrôle. Les différents microorganismes, leurs caractéristiques et leurs origines sont présentés dans le **Tableau 5**.

Les mutants de la souche GA1 ont été obtenus par délétion des gènes impliqués dans la biosynthèse des différents lipopeptides (*surfABCD* pour la surfactine, *fenABCD* pour la fengycine, *ituDABC* pour l'iturine, et *sfp* pour la 4'-phosphopantéthéinyl transférase requise à l'activation des synthétases de lipopeptides). Ces délétions ont été suivies par l'insertion d'un fragment recombinant contenant le gène de résistance au chloramphénicol ou à la phléomycine dans le cas des doubles mutants, par compétence naturelle induite par limitation en azote.

Toutes les souches sont conservées dans 40 % (v/v) de glycérol à -80 °C. Une colonie de bactérie prélevée sur une boîte de Tryptone - Extrait de levure solide (1 % de tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 0,5 % de NaCl (p/v) supplémenté avec 1,5 % d'agar (p/v)) est ensemencée dans le milieu TY liquide pour 18h à 30°C. Cette culture est additonnée de glycérol. La conservation des champignons est effectuée sous forme de spores. Celles-ci sont générées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu solide Dextrose - Pomme de terre (PDA, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) incubées 10 jours à 30 °C. Les spores sont récupérées avec de l'eau physiologique à laquelle 2 gouttes de Tween20 ont été ajoutées.

Tableau 5 : Les différentes souches utilisées, leurs caractéristiques et leurs origines

Souche	Caractéristique	Origine
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>sfp</i>	Mutant non producteur de lipopeptides	
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>srf</i>	Mutant non producteur de surfactine	Générées par l'équipe du Pr
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>itu</i>	Mutant non producteur d'iturine	Marc Ongena de
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>fen</i>	Mutant non producteur de fengycine	l'Université de Liège -
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>srf</i> Δ <i>itu</i>	Mutant monoproduit de fengycine	Gembloux
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>srf</i> Δ <i>fen</i>	Mutant monoproduit d'iturine	AgroBiotech (Publication soumise)
<i>B. velezensis</i> GA1 Δ <i>itu</i> Δ <i>fen</i>	Mutant monoproduit de surfactine	
<i>B. velezensis</i> FZB42	Souche productrice de lipopeptides	ABiTEP GMBH, Allemagne
<i>B. velezensis</i> S499	Souche productrice de lipopeptides	
<i>B. velezensis</i> 168	Souche non productrice de lipopeptides	
<i>B. licheniformis</i> ATCC14580	Souche capable de réduire le nitrate	
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Pathogène des plantes	
<i>Xanthomonas campestris</i> LMG582	Pathogène des plantes	Origines diverses, disponibles dans le soucier
<i>Rhodococcus fascians</i> D - 188	Pathogène des plantes	TERRA
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Pathogène des plantes	
<i>Botrytis cinerea</i>	Pathogène des plantes	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Pathogène des plantes	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pathogène des plantes	
<i>Trichoderma</i> sp. MUCL 58094	Non déterminée	Isolées du sol à l'Université de Lille
<i>T. atrobrunneum</i> MUCL 58095	Non déterminée	Lille

2. Méthodes d'analyses biologiques

2.1. Microscopie optique et électronique à balayage

Deux techniques de microscopie ont été utilisées pour l'observation des échantillons :

- La microscopie optique et la microscopie à microscope inversé Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Tokyo, Japon) : les échantillons sont placés entre lame et lamelle. De l'huile à immersion est utilisée pour les observations avec l'objectif x100.
- La microscopie électronique à balayage avec un microscope SEM JEOL à un voltage de 2 kV : les échantillons ont été prétraités pour ce genre d'observation. Pour ceux en condition planctonique, une filtration sous vide à travers un filtre miracloth (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) a permis d'immobiliser la biomasse sur le filtre. Pour les échantillons préalablement immobilisés sur un support, un carré de 1 cm² de celui-ci est découpé.

Les filtres et les fragments du support auxquels les échantillons à observer sont adhérents ont été traités par un gradient d'éthanol afin de remplacer l'eau par l'éthanol. À cet effet, ces derniers sont imprégnés dans trois bains successifs à 70 % d'éthanol pour une durée respective de 30 min, 30 min, et 12 h. Ils sont ensuite immergés dans 2 bains successifs de 30 min dans de l'éthanol 90 % et un bain final d'une heure dans de l'éthanol 100 % afin d'éliminer toute l'eau qui persiste dans la biomasse et la substituer par l'éthanol. Tous les bains sont effectués à 4 °C, et après le dernier bain, les échantillons peuvent être conservés plusieurs jours à 4 °C. Cette première étape est essentielle pour éviter la déformation de l'échantillon suite à l'évaporation violente de l'eau pendant la prochaine étape : le séchage. Celui-ci consiste à remplacer l'éthanol par du dioxyde de carbone (CO₂) en passant par le point critique du CO₂. Le passage par le point critique permet d'éliminer la tension de surface des échantillons en limitant le passage de l'état liquide à l'état gazeux et ainsi préserver sa structure. Le choix du CO₂ vient du fait que le point critique du CO₂ est facilement atteint dans les conditions du laboratoire par rapport à l'eau : une température de 31 °C contre 374 °C et une pression de 73,8 bar contre 221 bar. Une enceinte AgarScientific (Stansted, Royaume-Unis) est utilisée pour le séchage. Subséquemment, les échantillons nécessitent de devenir conducteurs pour pouvoir être aperçus par le microscope à balayage électronique. Ils sont alors posés sur un support et pulvérisés avec des ions grâce à une pulvérisation cathodique par un système JEOL à pulvérisateur ionique JFC-1100^E. Dans l'enceinte sous vide partiel de ce système, les échantillons sont couverts d'une fine couche de métal provenant d'atomes arrachés à l'argon ionisé.

2.2. Quantification de *T. harzianum*

La quantification du champignon sous ses formes de spores et de mycélium se fait respectivement par numération sur cellule de Burkert et par détermination de la matière sèche.

La solution de spores est diluée puis déposée sur la cellule de Burkert (VWR International, Darmstadt, Allemagne) (**Figure 15**).

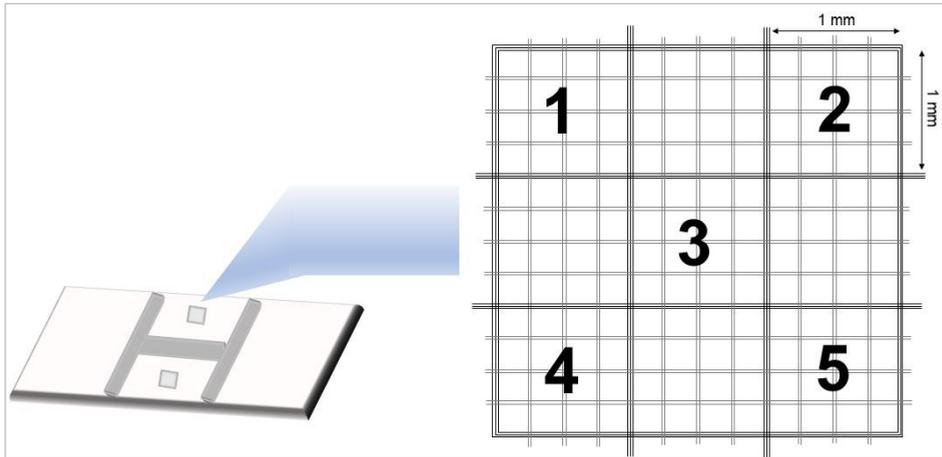


Figure 15 : Schématisation de la cellule de Burkert utilisée pour le comptage des spores de *T. harzianum* (les spores dans les cadrans 1, 2, 3, 4 et 5 sont comptées.)

Le comptage se fait à travers l'objectif x10 d'un microscope optique. Les spores se trouvant dans les 4 cadrans des coins ainsi que le cadran central sont comptés. La formule suivante permet de les convertir en concentration de spores :

$$\text{Concentration de spores} = \frac{\text{Spores décomptés} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Surface dénombrée} \times \text{Profondeur du champ}}$$

Concentration de spores en spore.μL⁻¹

Surface dénombrée en mm² sachant qu'un cadran fait 1 mm²

Profondeur du champ égale à 0,1 mm

Pour la biomasse fongique sous forme de mycélium, la détermination de la masse sèche a été choisie comme méthode de quantification. Pour les cultures sur supports métalliques, la masse du support est mesurée et notée avant de le placer dans les fioles. À la fin de la culture, le support est enlevé de la fiole, égoutté pendant 2 heures pour éliminer l'excès de milieu de culture et incubé 24 h à 106 °C. Ensuite, les supports sont pesés et la différence de masse avec le support initial constitue la masse sèche du matériel biologique attaché. En ce qui concerne les cultures planctoniques, elles sont centrifugées, le surnageant est éliminé et la biomasse récupérée est placée dans une cuve en métal de masse préalablement déterminée. La différence de masse avec celle obtenue après 24 h d'incubation à 106 °C représente la masse sèche de l'échantillon. La masse sèche déterminée correspond à celle dans 100 mL de culture.

2.3. Quantification de *B. velezensis*

Les bactéries ont été principalement quantifiées par densité optique mesurée à 600 nm (DO_{600nm}) avec un spectrophotomètre V-1200 (VWR International, Darmstadt, Allemagne) ou un lecteur de microplaque (SpectraMax M2e, Molecular Devices, Sigma-Aldrich) quand les cultures sont effectuées dans des microplaques de 96 puits. Dans le cas de coculture avec un champignon, les échantillons sont filtrés à travers un filtre seringue de porosité de 5 μm permettant d'éliminer la biomasse fongique pouvant interférer dans la lecture de la DO_{600nm} .

La concentration de *B. velezensis* a également été déterminée par cytométrie de flux (CF) avec le cytomètre en flux Accuri C6 (BD Accuri, San Jose CA, Etats-Unis) à un débit fixé à 35 $\mu L \cdot min^{-1}$. Préalablement, l'échantillon est dilué avec du tampon phosphate (PBS, 137 mM chlorure de sodium, 10 mM phosphate, 2,7 mM chlorure de potassium ; pH = 7,4) pour atteindre une concentration inférieure à 2500 cellules. μL^{-1} . Pour que les résultats soient statistiquement validés, 40000 cellules sont dénombrées pour calculer la concentration. De même que pour la mesure de la DO_{600nm} , les échantillons provenant de cocultures sont préalablement filtrés avec un filtre de 5 μm .

Pour établir une courbe de calibration DO_{600nm} – concentration, une culture de 24 h de *B. velezensis* dans du TY a été diluée en 5 dilutions successives de 2 en 2. La DO ainsi que la concentration par CF de chaque dilution a été déterminée afin de pouvoir tracer une courbe de calibration.

Lorsque *B. velezensis* est immobilisé sur le support métallique, la quantification est faite par détermination de la masse sèche attachée au support (comme décrite ci-dessus).

3. Génération de surnageants de culture

Le surnageant de culture constitue la phase liquide de celle-ci, qui renferme les molécules produites et sécrétées par les souches cultivées. Les surnageants des différentes conditions de culture sont récupérés par centrifugation de l'échantillon suivi par une filtration stérile de la phase liquide. Des filtres à seringue en acétate de cellulose (CA) d'une porosité de 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Allemagne) sont utilisés pour la filtration.

Un fractionnement a été mené sur le surnageant d'une culture de *T. harzianum* IHEM5437 de 6 jours dans le milieu nitrate (MM décrit dans la section 5) dans le but de séparer les molécules qu'il renferme selon leur masse moléculaire. Le surnageant est passé successivement à travers des filtres à centrifuger de porosité de 50, 30, 10 et 3 kDa (Amicon® Ultra – 15, Merck Millipore Ltd, Cork Ireland). Dans un premier temps, le surnageant de *T. harzianum* est placé dans le tube contenant la membrane de cut off (ou seuil de coupure) 50 kDa. Le tube est centrifugé 30 min à 5000 rpm. Le perméat est ensuite filtré mais avec un cut off de 30 kDa, et ainsi de suite. À chaque

étape, le rétentat est lavé deux fois avec de l'eau physiologique (toujours à travers la même membrane). À la fin du fractionnement, 5 fractions sont générées :

- Fraction A : molécules de masse moléculaire supérieure à 50 kDa
- Fraction B : molécules de masse moléculaire comprise entre 30 et 50 kDa
- Fraction C : molécules de masse moléculaire comprise entre 10 et 30 kDa
- Fraction D : molécules de masse moléculaire comprise entre 3 et 30 kDa
- Fraction E : molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa

Certaines molécules pouvant être retenues dans les filaments de *T. harzianum*, des extractions au méthanol ont été effectuées à partir de biomasse de coculture en planctonique (récupérée par centrifugation) ou sur support métallique (récupérée avec un scalpel). Les biomasses sont plongées dans 10 mL de méthanol, mélangées vigoureusement et incubées pendant 2 h puis centrifugées 30 mins à 8000 x g. La phase liquide contenant le méthanol et les molécules extraites de la biomasse est filtrée avec des filtres à seringue en polytétrafluoroéthylène (PTFE) (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Allemagne) d'une porosité de 0,22 µm. Ensuite, une concentration de l'échantillon est faite par évaporation totale du méthanol avec un concentrateur centrifuge sous vide speedvac (ThermoScientific, Rochester, Etats-Unis) dont le programme est réglé pour l'évaporation de solvant à 40 °C. Les dépôts sont ensuite solubilisés dans 500 µL d'eau et refiltrés avec des filtres de 0,22 µm avant les analyses HPLC requises.

4. Culture dans le milieu riche

4.1. Composition du milieu et conditions de culture

Le milieu de culture utilisé dans la première partie des expériences est le milieu Tryptone-Extrait de levure décrit précédemment, auquel 0,1 mM de $MnCl_2$ a été ajouté [281]. Des fioles de 250 mL à col large contenant 100 mL de TY ont été utilisées pour effectuer les cultures. Dans certaines conditions, un support (Laboratory packings, Sulzer Chemtech, Winterthur, Suisse) est utilisé pour l'attachement des biomasses et la favorisation de la formation de biofilms. Ce support, formé de 2 feuilles en métal structuré découpées en rectangle de dimensions de 80 × 50 mm et attachées avec un collier de serrage (**Figure 16**), est inséré dans les fioles avant l'autoclavage.



Figure 16 : Support métallique composé de deux feuilles en métal structuré attachées avec un collier de serrage utilisé pour la culture en biofilm dans des bioréacteurs

Après chaque expérience, le support est traité pendant 24 h avec une solution de 4 M de NaOH pour faciliter le détachement du biofilm, puis incubé une heure dans de l'eau distillée à 100 °C [351]. Les cultures sont incubées à une température de 30 °C de 24 h jusqu'à 96 h selon les expériences.

L'inoculation du champignon est faite à partir d'une solution de spores générée comme décrit ci-dessus, pour une concentration finale de 2.10^5 spore.mL⁻¹.

L'inoculum bactérien est issu d'une préculture d'une nuit dans le milieu TY. La préculture est centrifugée pendant 5 min à 8000 x g, et le culot de cellules resuspendu dans de l'eau physiologique est ajouté à la culture pour atteindre une DO_{600nm} finale de 0,01.

Des monocultures de *B. velezensis* GA1, de *T. harzianum* IHEM5437 et des cocultures de ces souches sont effectuées dans ce milieu TY.

4.2. Optimisation des conditions de culture et d'attachement sur support

4.2.1. Le pH

L'effet de la régulation du pH sur l'attachement de *B. velezensis* GA1 sur le support a été suivi dans un bioréacteur à biofilm à film tombant, constitué d'un bioréacteur conventionnel de 2 L (BIOSTAT B Plus, Sartorius Stedim, Schaerbeek, Belgique) contenant le milieu de culture TY, relié à une colonne qui renferme 5 disques de support métallique superposés et de poids connu, avec le milieu de culture y circulant en continu (**Figure 17**).



Figure 17 : Schématisation du bioréacteur à biofilm à film tombant, constitué d'un bioréacteur conventionnel de 2 L relié à une colonne renfermant 5 disques de support métallique superposés. Le milieu de culture circule du bioréacteur, où se trouvent les sondes permettant le contrôle du pH et de la température, vers la colonne, puis de la colonne vers le bioréacteur

L'inoculation du bioréacteur se fait à partir d'une préculture d'une nuit dans le milieu TY à l'aide d'un système de pompage qui prélève la préculture stérilement. Dans le bioréacteur, la culture est maintenue à 30 °C avec une agitation de 400 rpm. Dans une première condition, le pH n'a pas été contrôlé. Dans la seconde, il a été maintenu à 6,5 grâce au système de régulation de pH du bioréacteur qui supplémente le milieu de culture avec de l'acide chloridrique ou de l'hydroxyde de sodium. Après 48 h de culture, les 5 disques de support métallique sont prélevés de la colonne et égouttés pendant 2 h pour retirer le surplus de milieu. La matière sèche est ultérieurement déterminée après 24 h d'incubation à 106 °C.

4.2.2. Vitesse d'agitation

La vitesse d'agitation optimale pour l'attachement de la biomasse sur le support métallique est évaluée en fiole. En respectant les conditions d'inoculation décrites dans la section 4.1, 3 vitesses d'agitation différentes : 80, 100 et 120 rpm ont été testées pour les cultures de *T. harzianum* et *B. velezensis* séparément. Chaque 24 h et pendant 4 jours, les supports, de masse préalablement déterminée, sont retirés des fioles, égouttés pendant 2 h puis placés 24 h à 106 °C afin de pouvoir déterminer la masse de la matière sèche attachée. Les résultats présentés sont basés sur des expérimentations menées en triplicata.

4.2.3. Inoculation séquentielle

Plusieurs stratégies d'inoculation ont été analysées pour déterminer celle favorisant la croissance des deux souches en coculture :

- Une co-inoculation dans laquelle la bactérie et le champignon sont ajoutés simultanément au début de la culture
- Une inoculation séquentielle où *B. velezensis* est inoculé 24 h avant les spores de *T. harzianum*
- Une inoculation séquentielle où les spores de *T. harzianum* sont inoculées 24 h ou 48 h avant l'ajout de *B. velezensis*

Pour toutes les stratégies envisagées, l'inoculation des cultures a été faite dans les conditions décrites dans la section 4.1, dans des fioles contenant un support métallique. Après l'inoculation de la seconde souche, les fioles sont maintenues en incubation pendant 72 h. La DO_{600nm} de la phase planctonique est déterminée chaque 24 h. La biomasse qui a adhéré au support est déterminée par le calcul de la matière sèche sans séparation des souches chaque 24 h également. À la fin de l'incubation, des observations microscopiques de la phase planctonique et de la phase immobilisée sur support sont effectuées. Les résultats présentés sont basés sur des expérimentations menées en triplicat.

En plus de la croissance, la production de lipopeptides par la souche GA1 a été suivie par UPLC-MS (méthode décrite dans la section 6.2) afin d'évaluer l'effet de la coculture avec *T. harzianum* sur la génération de ces métabolites à activité antifongique.

4.3. Effet des lipopeptides de *B. velezensis* sur *T. harzianum*

4.3.1. Test de confrontation sur boîte avec des mutants de *B. velezensis*

L'effet des lipopeptides sécrétés par *B. velezensis* a été déterminé par l'utilisation de mutants de la souche GA1, produisant 1 ou 2 lipopeptides, ainsi qu'avec une souche ne produisant aucun lipopeptide (**Tableau 5**). La souche GA1 est utilisée comme témoin.

Les tests sont effectués sur des boîtes de TY solide. Les champignons sont inoculés à partir d'une solution de spores de concentration ajustée à 2.10^5 spore.mL⁻¹, 24 h avant l'inoculation des bactéries. Cinq microlitres de la solution de spores sont déposés à proximité du centre de la boîte de Pétri comme décrit dans la **Figure 18**. Les boîtes sont incubées, couvercle vers le bas, à 30 °C.

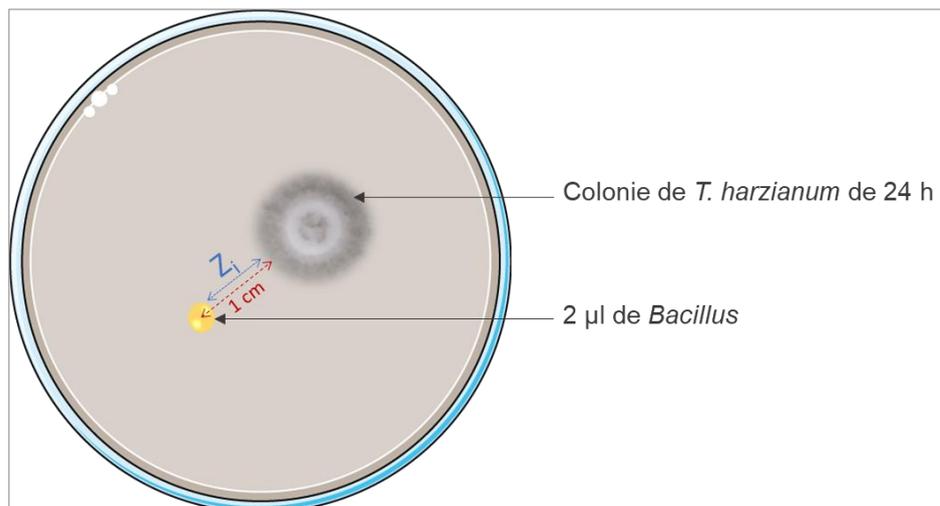


Figure 18 : Détermination de l'effet antagoniste des différents mutants de *B. velezensis* GA1 vis-à-vis de *T. harzianum* IHEM5437 sur boîte de Pétri contenant le milieu TY solide. Une goutte contenant les cellules bactériennes est placée à 1 cm de la colonie de champignon. La zone d'inhibition Z_i entre les deux colonies de microorganismes est mesurée après 48 h d'incubation.

L'inoculum bactérien est préparé à partir d'une culture de 24 h dans du TY à 30 °C. La culture est centrifugée et le culot suspendu dans de l'eau physiologique pour atteindre une DO_{600nm} de 0,01. Deux microlitres de cette solution sont déposés à 1 cm de distance de la colonie du champignon dont les spores ont germé. Les boîtes sont incubées pour 48 h supplémentaires couvercle vers le bas à 30 °C.

L'inhibition ou non de la croissance de *T. harzianum* est évaluée par la mesure de la distance entre sa colonie et celle des souches de *B. velezensis*, correspondant à la zone d'inhibition Z_i .

4.3.2. Test de culture de *T. harzianum* avec supplémentation de lipopeptides dans le milieu

L'effet des lipopeptides sur la croissance du champignon est déterminé, plus précisément, en réalisant des cultures de *T. harzianum* dans le milieu TY avec ajout de chacun des 3 lipopeptides (surfactine, fengycine et iturine) séparément. La surfactine et la fengycine utilisées ont été produites respectivement par les souches de *B. subtilis* BBG131 et BC27, selon le protocole décrit par Desmyttere *et al.* (2019) [352]. La mycosubtiline, appartenant à la famille des iturines et utilisée dans cette expérience, a été produite par la souche BBG125 selon le protocole décrit par Béchet *et al.* (2013) [353]. Des solutions de lipopeptides de concentration de 12 g.L⁻¹ sont préparées dans 10 mL d'eau distillée. Trois millilitres de chaque solution sont ajoutés à une culture de *T. harzianum* de 20 mL, réalisée en triplicat. Les cultures du champignon contiennent alors 36 mg de lipopeptide pur. Les cultures sont incubées à 30 °C avec agitation à 100 rpm pendant 48 h. La matière sèche est calculée par la suite

afin d'évaluer la croissance du champignon dans ces conditions en comparaison avec une culture témoin sans ajout de lipopeptides.

4.4. Effet du surnageant de *T. harzianum* sur l'activité antifongique et antibactérienne de *B. velezensis*

Pour élucider l'impact des molécules produites par *T. harzianum* sur l'activité antimicrobienne de la souche GA1, des cultures de cette bactérie dans du TY sont effectuées en absence ou en présence de 5 % ou 10 % (v/v) de surnageant de *T. harzianum*. Dans un volume final de culture de 100 mL, 0, 5 ou 10 mL d'un surnageant, issu d'une culture de 48 h de *T. harzianum*, sont ajoutés. Après 24 h de culture, les différents surnageants de *B. velezensis* sont récupérés selon le protocole décrit dans la section 3.

Sur une boîte de Pétri contenant du milieu TY solide, 4 puits équidistants sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce. Les pathogènes sont ensuite ensemencés en stries à l'aide d'un coton-tige de façon à couvrir de manière homogène toute la boîte. Le coton-tige est trempé dans une solution d'eau physiologique contenant les bactéries ou les spores des champignons pathogènes. La solution de bactérie est préparée à partir de cellules récupérées d'une culture de 48 h, lavées et resuspendues dans l'eau physiologique pour atteindre une DO_{600nm} de 0,01. La solution de spores des champignons est récupérée à partir d'une boîte de Pétri et la concentration est ajustée à 2.10^5 spore.mL⁻¹. Les surnageants des différentes cultures de *B. velezensis* sont déposés respectivement dans 3 puits. Un volume de 100 µL est déposé à chaque fois. Dans le 4^{ème} puits, 100 µL d'eau distillée stérile sont ajoutés pour servir comme témoin négatif. La **Figure 19** reprend le dispositif expérimental de la méthode des puits.

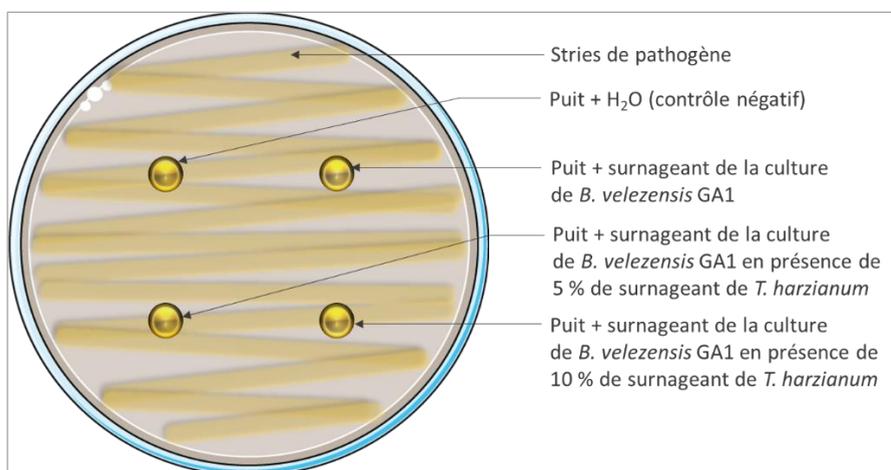


Figure 19 : Détermination de l'activité antifongique du surnageant de *B. velezensis* GA1 par la méthode des puits en ajoutant les variants de ce surnageants dans les puits et en analysant la zone d'inhibition autour des puits

Après 48 h d'incubation à 30 °C, le diamètre de la zone d'inhibition qui représente la zone de non-croissance du pathogène autour des puits est mesurée et permet d'estimer l'effet inhibiteur des surnageants de *B. velezensis*. Les résultats présentés sont basés sur des expérimentations menées en triplicat.

5. Cultures en milieu nitrate

5.1. Composition du milieu et conditions de culture

Un deuxième milieu, le milieu nitrate (MN), est utilisé pour cultiver les microorganismes [354]. Celui-ci contient des éléments sous forme minérale à l'exception de la source organique de carbone, le glucose. L'azote y est présent uniquement sous forme de nitrate. Tous les composants sont ajoutés dans de l'eau distillée stérile à partir de solutions stocks dont les concentrations et le facteur de dilution dans le milieu de culture final sont décrits dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Composition du milieu nitrate MN

Solution	Concentration de la solution stock	Facteur de dilution dans le volume final	
Glucose	10 % (p/v)	10	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 M	500	
Minéraux	NaNO ₃	3,5 M	
	KCl	0,35 M	50
	KH ₂ HPO ₄	0,55 M	
Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec 4 M de NaOH avant autoclavage.			
Oligoéléments	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	38 mM	
	H ₃ BO ₃	89 mM	
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	12,5 mM	
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	9 mM	500
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	3,55 mM	
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	3,2 mM	
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	3,1 mM	
EDTA-Na ₂ , 7H ₂ O	87 mM		
L'EDTA (acide éthylènediaminétriacétique) est dissout en premier dans un petit volume d'H ₂ O en ajustant le pH avec 4 M de NaOH. Les autres éléments sont ajoutés ensuite séparément au fur et à mesure de leur dissolution. Après ajustement du volume, la solution est stérilisée par filtration avec des filtres seringues d'une porosité de 0,22 µm.			

Les microorganismes sont inoculés simultanément, dans les mêmes ratios que ceux décrits dans le milieu TY, dans des fioles contenant 100 mL de MN. Les cultures sont incubées à 30 °C avec une agitation de 100 rpm de 48 h jusqu'à 6 jours. Le support métallique est utilisé dans certaines conditions.

5.2. Cultures dans le milieu nitrate avec différentes sources d'azote

Des cultures de la souche GA1 ont été effectuées dans le MN supplémenté avec différentes sources d'azote organique afin d'étudier l'effet de la disponibilité d'azote sur sa croissance ainsi que son interaction avec la souche IHEM5437 par le biais de coculture.

En plus du nitrate, présent initialement dans le MN, des monocultures de bactérie et des cocultures avec le champignon sont réalisées avec supplémentation de sulfate d'ammonium pour une concentration finale de 10 mM. Toutes les cultures sont incubées pendant 48 h (6 jours pour les cocultures). La croissance de la bactérie est exprimée en DO_{600nm} et celle du champignon en matière sèche.

Un criblage a été effectué pour déterminer les acides aminés qui constituent une source d'azote assimilable par *B. velezensis* GA1. Des solutions stocks de 10 mM d'alanine, arginine, asparagine, aspartate, cystéine, glutamate, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine, et valine sont préparées et amendées dans le MN à concentration finale de 1 mM. Les analyses sont faites dans des microplaques de 96-puits. Un volume de 200 μ L de MN préalablement supplémenté avec l'acide aminé et inoculé par la bactérie est placé dans un puits. Chaque condition de culture est effectuée en triplicat, dans 3 puits différents. Les microplaques sont ensuite incubées dans le lecteur de microplaque pendant 48 h à 30 °C avec une faible agitation chaque 10 minutes (avant la lecture). Une autre source d'azote organique a également été étudiée en la supplémentant dans le MN en monoculture et coculture : les casaminoacides avec une proportion massique finale de 0,1 % (p/v). Les mêmes analyses décrites précédemment ont permis de suivre la croissance de la bactérie dans cette condition.

Par ailleurs, la source d'azote principale du MN a été modifiée. Dans un premier temps, la solution stock de minéraux_{nitrite} a été préparée en remplaçant les 3,5 M de $NaNO_3$ par 3,5 M de $NaNO_2$. Des monocultures de *B. velezensis* et de *T. harzianum* ainsi que des cocultures sont réalisées dans ce milieu. Après 6 jours d'incubation à 30 °C avec agitation à 100 rpm, la DO_{600nm} des cultures est déterminée ainsi que la masse sèche du champignon. Des monocultures de *B. velezensis* ont aussi été effectuées dans ce MN_{nitrite} supplémenté avec 10 mM d'ammonium. Leur croissance est déterminée via la DO_{600nm} après 48 h d'incubation. Dans un second temps, le nitrate de la solution de minéraux a été remplacé par 1,75 M de sulfate d'ammonium (tout en conservant le nombre de moles d'azote) pour étudier l'effet de la présence de cette source d'azote uniquement sur la croissance de *B. velezensis* en monoculture et coculture. L'impact sur la croissance a été déterminé via la DO_{600nm} après 48 h d'incubation.

Afin de vérifier si les hypothèses émises peuvent être généralisées à d'autres souches de *Bacillus* et *Trichoderma*, différentes cultures et analyses similaires à celles décrites ci-dessus ont été réalisées. Les souches testées sont *B. velezensis* FZB42, *B. velezensis* S499, *B. licheniformis* ATCC14580, *T. harzianum* atrobrunneum

MUCL58095, *Trichoderma* sp MUCL58094, citées dans le **Tableau 5**. Les conditions de culture varient selon la source d'azote du MN : nitrate ou nitrite.

Dans le MN et MN_{nitrite}, des monocultures des différentes souches de *Bacillus* et de *Trichoderma* et des cocultures de différents couples sont faites dans des fioles de 50 mL contenant 20 mL de milieu de culture.

Pour déterminer la source d'azote fournie par *T. harzianum* dans le MN, des cultures de la souche GA1 ont été faites dans ce même milieu avec supplémentation de surnageant de *T. harzianum*, des différentes fractions du surnageant (détaillées dans la section 3) et le mycélium désactivé du champignon. Ce mycélium est récupéré d'une culture de 6 jours de *T. harzianum* dans le MN par centrifugation pendant 30 min à 5000 x g. La biomasse est lavée 3 fois avec de l'eau physiologique pour éliminer tous les résidus du surnageant (alternance de centrifugation et resuspension). La suspension finale est placée dans une bouteille et autoclavée pendant 20 min à 121 °C. Après autoclave, la biomasse désactivée est distribuée stérilement dans les fioles dans lesquelles le milieu sera ajouté.

Toutes les cultures dans les différentes conditions sont menées en triplicat.

5.3. Etude de la viabilité et l'état métabolique des cellules de *B. velezensis* par cytométrie en flux

En plus du comptage des cellules bactériennes, la technique de CF a été utilisée pour déterminer la viabilité et l'état métabolique des cellules de *B. velezensis* GA1 dans le MN et en coculture avec *T. harzianum*, en condition planctonique ou immobilisée. Dans les cultures immobilisées sur support, l'analyse est faite sur les cellules présentes dans la phase planctonique uniquement. La détermination de la viabilité des cellules est possible grâce à l'utilisation de l'iodure de propidium (PI). Ce contre-colorant rouge est un intercalant des séquences d'ADN. Cependant, sa pénétration dans la cellule dépend de la perméabilité de sa membrane qui, dépend elle-même de la viabilité de la cellule. En d'autres termes, uniquement quand la cellule est morte, sa membrane est perméabilisée et émettra donc une fluorescence rouge en raison de l'intercalage du PI dans son génome. La fluorescence est détectée par les canaux du CF.

Le réactif RedoxSensor green (RSG) est utilisé pour évaluer l'activité métabolique des cellules de la souche GA1. Ce réactif permet d'examiner l'activité réductase des cellules et ainsi le fonctionnement des chaînes de transporteurs d'électrons. Quand la cellule est métaboliquement active, ses transporteurs d'électrons le sont également et permettront de réduire le RSG et émettre une fluorescence verte. La fluorescence est détectée par les canaux du CF.

Des prélèvements quotidiens de *B. velezensis* dans des monocultures et des cocultures avec *T. harzianum* en conditions planctoniques et sur support sont effectués stérilement pendant 6 jours. L'échantillon est tout d'abord filtré avec un filtre seringue de porosité de 5 µm pour éliminer la biomasse fongique ainsi que les biofilms pouvant se former dans la culture. Ensuite, l'échantillon est dilué avec du PBS pour atteindre

une concentration inférieure à $2500 \text{ cellule} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dans un volume final de 2 mL. Ces 2 mL sont ensuite divisés en deux volumes égaux dans deux tubes de 1,5 mL. Dans le premier tube 5 μL de PI sont ajoutés et dans le second 1 μL de RSG. Les mélanges sont incubés 10 min à l'abri de la lumière puis analysés par CF à un débit fixé à $35 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Un seuil de détection à 30000 au niveau du forward scatter a été fixé. Les canaux de détection de fluorescence rouge (FL3) pour les échantillons traités avec le PI et de fluorescence verte (FL1) pour ceux avec le RSG ont été utilisés. Les résultats sont exprimés en termes de side scatter (SSC), forward scatter (FSC) et de fluorescence rouge pour le PI et verte pour le RSG. Pour que les résultats soient statistiquement validés, 40000 cellules sont dénombrées pour calculer la concentration. Toutes les expérimentations sont menées en triplicat.

La visualisation des résultats est faite grâce à un code développé sur Spyder, Anaconda, un outil Python dédié au développement d'applications pour la gestion des données. Le code vise à créer des graphes répartissant les données en fonction de leur SSC, FSC et fluorescence. Un code couleur est utilisé pour exprimer l'abondance des populations cellulaires, le rouge pour les populations les plus concentrées et le bleu pour les populations faibles, en passant par le jaune et le vert. Les résultats obtenus sur le logiciel de traitement de données CFlow[®] Plus du CF sont exportés sous le format de FCS et serviront d'entrée pour le code.

5.4. Effet de *T. harzianum* sur la production de lipopeptides par *B. velezensis*

5.4.1 Effet du surnageant de *T. harzianum*

Pour étudier la capacité de *T. harzianum*, et en particulier des molécules produites par ce champignon dans le MN, à dégrader les lipopeptides, des solutions de lipopeptides sont mélangées au surnageant de *T. harzianum*. La surfactine, la fengycine et la mycosubtiline (un membre de la famille des iturines) utilisées dans cette expérience sont produites par les souches *B. subtilis* BBG131, BC27 et BBG125 respectivement comme décrit précédemment [5]. Chaque solution est préparée dans un volume de 1,5 mL d'eau à une concentration de $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et filtrée avec un filtre seringue à $0,22 \mu\text{m}$ de porosité. La solution est ensuite répartie dans 3 tubes de 1,5 mL pour mener les expériences en triplicats. Dans chaque tube, 0,5 mL de surnageant de *T. harzianum* provenant d'une culture de 6 jours dans le MN est ajouté. La concentration en lipopeptides est suivie par UPLC chaque heure, pendant les 4 premières heures, puis à 24 h.

Le pH du milieu de culture de la coculture de *B. velezensis* et *T. harzianum* est aussi suivi pour étudier l'effet de sa modification par *T. harzianum* sur les lipopeptides. Une coculture est effectuée dans un milieu nitrate tamponné avec $21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de MOPS à un pH de 6,5. Le MOPS est ajouté dans la solution H_2O du MN et le pH est réglé avec du NaOH à 4 M.

5.4.2 Effet de l'interaction physique *T. harzianum* – *B. velezensis*

L'impact de l'interaction physique entre les souches *T. harzianum* IHEM5437 et *B. velezensis* GA1, c'est-à-dire l'effet qu'a le contact de biomasse des deux souches sur la production de lipopeptides ne peut être élucidé qu'en séparant les deux souches. Cette séparation doit tenir compte du maintien de l'échange de métabolites interspécifique. Un dispositif de coculture avec séparation de membrane a été mis en place en se basant sur le protocole décrit dans la publication de Heyse *et al.* (2019) [340] avec de légères modifications. Les puits d'une microplaque à 6 puits sont remplis avec 3 mL de MN et inoculés avec 10^3 spore.mL⁻¹ de *Trichoderma*. Un insert contenant une membrane ayant une porosité de 0,4 µm est placé dans chaque puits et 3 mL de MN inoculés avec la bactérie à une DO_{600nm} finale de 0,01 y sont versés. La plaque est scellée avec du parafilm et placée dans une enceinte préalablement saturée avec de l'eau pour minimiser l'évaporation. Dans le même objectif, des microplaques dont les puits sont remplis avec 3 mL d'eau distillée sont placées en-dessus des microplaques contenant les cocultures. Les plaques sont incubés 6 jours à 30 °C avec une agitation de 80 rpm. Le transit de molécules entre les différents compartiments (puits et insert) a été préalablement vérifié en utilisant du colorant textile, placé dans le puits ou l'insert. Après 2 h, la migration de la couleur a été suivie par observation à l'œil nu.

5.5. Effet de la coculture sur l'activité antifongique et antibactérienne de *T. harzianum* et *B. velezensis*

La détermination de l'activité antimicrobienne de la coculture *T. harzianum* -*B. velezensis* est faite par la méthode de puits décrite dans la section 4.4. Un pathogène parmi la liste du **Tableau 5** est d'abord ensemencé sur une boîte TY. Ensuite, les surnageants d'une monoculture de *T. harzianum* et d'une coculture de ce champignon avec la souche GA1 sont ajoutés respectivement dans un puits creusé dans cette boîte. Dans un 3^{ème} puits, 100 µL d'eau distillée stérile sont ajoutés pour servir comme témoin négatif.

Après 48 h d'incubation à 30 °C, le diamètre de la zone d'inhibition qui représente la zone de non-croissance du pathogène autour des puits est mesuré. Les résultats présentés sont basés sur des expérimentations menées en triplicata.

6. Méthodes d'analyses chimiques

6.1. Quantification du glucose par HPLC

La consommation du glucose dans le MN des monocultures de *B. velezensis* et *T. harzianum* et des cocultures, en conditions planctoniques et immobilisées sur support est suivie. Le profil de consommation de cette unique source de carbone reflètera l'état de croissance des souches dans les différentes conditions. Ces analyses sont faites par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC : High-Performance Liquid Chromatography, Agilent 1200 pompe binaire, VWD). Chaque jour, pendant

6 jours, un échantillon est pris de chaque condition de culture, filtré avec un filtre 0,22 μm et analysé par HPLC. Une colonne d'exclusion d'ions Aminex HPX-87H de dimensions 300 mm x 7,8 mm est utilisée à une température de 40 °C. Le volume d'injection est de 10 μL et l'élution est réalisée avec 5 mM d'acide sulfurique à un débit de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 35 min. La détection du glucose est faite par réfractométrie. Les résultats sont analysés avec le programme Open Lab CDS 2.3, la concentration du glucose est calculée à partir de l'aire du pic correspondant à ce sucre. Une droite d'étalonnage est établie à partir d'une solution mère de 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose diluée à plusieurs concentrations permettant d'établir la conversion entre l'aire des pics et la concentration.

6.2. Détection et quantification des lipopeptides par UPLC-MS

La production de lipopeptides par la souche GA1 dans les différentes conditions de culture est suivie par chromatographie en phase liquide à haute pression (UPLC : Ultra-Performance Liquid Chromatography). Cette technique permettra de séparer les différentes formes de lipopeptides qui seront élués à des temps différents. Leur identification est ensuite confirmée par la mesure de leur masse grâce à un spectromètre de masse (Waters, Milford, Massachusetts, Etats-Unis) couplé à l'UPLC. Le spectromètre est réglé en modes négatif (ESI-) and positif (ESI+) à un voltage de 60 V pour détecter le rapport m/z des molécules allant de 300 à 2048. La colonne utilisée est une Acquity UPLC® BEH C18 de dimensions 2,1 \times 50 mm avec des particules de diamètre de 1,7 μm (Waters, Milford, Massachusetts, Etats-Unis). La colonne est placée dans le four de l'UPLC réglé à 40 °C.

Un volume de 10 μL de surnageant de culture est injecté pour chaque analyse. La séparation et l'élution des lipopeptides se font grâce à un gradient d'acétonitrile de 7 min à un débit de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Deux solvants sont utilisés : l'eau milliQ additionnée de 0,1 % d'acide formique désignée par le solvant A et l'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique désigné par le solvant B. Pendant les premières 2,4 min, un ratio de 70 % A : 30 % B est établi. Le pourcentage du solvant B est ensuite élevé jusqu'à 95 % et maintenu pendant 2,8 min. Le gradient finit par une phase de 1,8 min au même ratio qu'au départ.

Pour le calcul de la concentration des lipopeptides, des standards sont préparés avec des poudres pures dissoutes dans l'éthanol à une concentration de 0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. À partir de cette solution mère, plusieurs dilutions sont faites afin de réaliser une droite d'étalonnage. Le dosage de ces standards lors de l'analyse des surnageants de culture permet d'établir une droite d'étalonnage qui sert à calculer la concentration des lipopeptides dans l'échantillon. L'aire des différents pics correspondants à chaque lipopeptide est calculée par intégration avec le logiciel MassLynx et convertie en concentration en se basant sur la droite d'étalonnage.

6.3. Analyse des composants du surnageant par MALDI-TOF

Les protéines/peptides présents dans le surnageant de *T. harzianum* et ses différentes fractions, générées dans la section 3, ont été analysés par MALDI-TOF (Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice couplée à un analyseur en masse à temps de vol).

Cette technique permet de déterminer rapidement la masse des molécules via un processus impliquant une étape d'ionisation à l'aide d'un laser dans la source MALDI, une séparation des ions dans un champ électrostatique selon leur temps de vol dans l'analyseur TOF jusqu'au détecteur. Le rapport masse / charge (m/z) des molécules ionisées, associé à leur temps de vol, est alors déterminé. L'ionisation directe des molécules à l'aide du laser ne peut se faire qu'en présence d'une matrice, mélangée en excès à l'échantillon, qui permet d'absorber l'énergie du laser et de transmettre une énergie plus faible permettant l'ionisation « douce » des molécules. La matrice utilisée ici est de l'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique à 10 g.L^{-1} dissout dans de l'acétonitrile supplémenté par 2 % (v/v) d'acide trifluoroacétique. A cet effet, une co-cristallisation sur cible MALDI (AnchorChip™, Bruker Daltonik) de $0,5 \mu\text{L}$ d'échantillon et de $0,5 \mu\text{L}$ de matrice est effectuée. La matrice est également déposée seule en tant que contrôle négatif. Les dépôts sont ensuite analysés par le spectromètre de masse Autoflex Speed™ TOF/TOF (Bruker Daltonik) piloté par le logiciel FlexControl™ 3.4 (Bruker Daltonik). La mesure des rapports m/z est faite en mode positive linéaire et réfléctron. Les données sont générées suite à 700 coups de laser et les spectres sont visualisés et traités via le logiciel Flexanalysis™ 3.4 (Bruker Daltonik). Une calibration a été préalablement effectuée avec les ions monoisotopique $[M+H]^+$ de la bradykinine 1-7, l'angiotensine I, l'angiotensine II, la substance P, la bombésine et l'hormone adrénocorticotrope, provenant du kit standard de calibration de peptides (Bruker Daltonik).

6.4. Analyse des composants du surnageant par HPLC-ESI-Q/TOF

La combinaison de l'HPLC à un spectromètre de masse de haute résolution permet dans un premier temps la décomplexification des échantillons par la séparation des molécules selon leur hydrophobicité et dans un second temps leur séparation selon leur rapport m/z avec une précision de mesure nettement supérieur au MALDI-TOF. Cette technique nous permettra également de détecter des plus petits ions (inférieurs à un rapport m/z de 800 Da) généralement non détectés par MALDI-TOF.

Les différents échantillons (surnageant de *T. harzianum* et les fractions 3, 4 et 5) ont été séchés dans des tubes en verre à l'aide d'un concentrateur centrifuge sous vide (Genvac miVac Quattro, Biopharma Technologies France) puis repris dans $1,5 \text{ mL}$ de H_2O amendés de $0,1 \%$ TFA (v/v).

La fraction E, renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa , a été concentrée 15 fois pour permettre la détection des molécules en faible concentration. A ce fait, $1,5 \text{ ml}$ de cet échantillon sont placés dans un tube en verre et

séchés par un concentrateur centrifuge sous vide. Le culot a été repris dans 100 μL d'eau / 0,1% TFA et centrifugé 10 min à 8000 x g.

Dix microlitres de chaque échantillon ont été séparés par HPLC (ACQUITY UPLC system, Waters Corporation) grâce à une colonne C18-AQ (250 x 3 mm, particules de 3 μm , Interchim, Montluçon, France). L'éluion est faite avec un débit de 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ d'un gradient établi avec les solvants A et B ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ FA (v/v) et ACN + 0,1 % FA (v/v) respectivement) comme suit : passage de 1 à 30 % de solvant B en 45 min, suivi d'un passage à 95 % en 5 min et stabilisation à 95 % pendant 4 min. A la sortie de la colonne, l'éluât est analysé par le spectromètre de masse Synapt G2-Si™ (Waters Corporation). Les molécules sont ainsi ionisées par électrospray (à 150 °C et avec une tension de 3000 et 60 V pour le capillaire et le cône respectivement) à laquelle succède la séparation et la détection des rapports m/z des molécules ionisées dans un analyseur quadripôle couplé à un temps de vol (Q/TOF). L'analyse est effectuée en mode positif et en acquisition dépendante des données (DDA de l'anglais data dependent acquisition) pour les molécules de valeur m/z entre 50 Da et 2000 Da, avec un temps de balayage de 0,2 sec. Pour l'échantillon de la fraction E concentrée, une analyse MS en tandem est réalisée afin d'obtenir des informations sur la séquence des peptides. Dans cet objectif, un maximum de 10 ions obtenus par l'analyse MS est fragmenté par dissociation induite par collision (CID de l'anglais Collision Induced Dissociation) avec à un temps de balayage de 0,1 sec. Au cours de l'analyse, la leucine enképhaline ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 556,632$ Da) est injectée pendant 0,5 sec chaque 2,5 min afin de suivre et corriger les erreurs de mesure de masse.

Pour identifier les peptides dans la fraction 5 du surnageant de *T. harzianum* une recherche par confrontation dans la base de données UniProt restreinte au protéome de l'organisme *Trichoderma harzianum* est effectuée via PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions). Cette identification est faite avec une tolérance de masse de 35 ppm pour l'ion parent, de 0,2 Da pour les fragments et en prenant en considération l'oxydation variable de la méthionine. La pertinence des identités protéiques et peptidiques a été jugée en fonction de leur score dans le logiciel de recherche (p value < 0,05, taux de faux positifs < 1 %).

6.5. Analyse des acides aminés par HPLC

Le contenu en acide aminé du surnageant de *T. harzianum* a été décrypté via une analyse HPLC. Des dosages d'acides aminés totaux et acides aminés souffrés sont effectués.

Pour cela, des échantillons sont pris à partir de 3 cultures fongiques chaque 24 h à partir du 3^{ème} jour de culture et jusqu'au 6^{ème} (échantillons en triplicat).

La quantité d'azote totale dans les surnageants a été déterminée en utilisant le kit de dosage Test 'N Tube avec une plage de mesure de 2 à 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (HACH Company, Loveland, Colorado). Ce dosage permettra de calculer ultérieurement le volume nécessaire à analyser pour atteindre la concentration seuil en azote pour la détection par l'HPLC. Cette méthode consiste en une digestion au persulfate conduisant à la libération de l'azote, suivi d'une réaction colorimétrique et un dosage à l'aide d'un

spectrophotomètre HACH LANGE DR/2000 (HACH Company, Loveland, Colorado). Le dosage est fait selon le protocole préconisé par le fournisseur.

Un second dosage d'azote a été effectué par la méthode Kjeldahl afin de déterminer la concentration d'azote présent sous forme oxydable, et par la suite les autres formes que le nitrate. Le nitrate, présent en grande concentration, est susceptible de biaiser le calcul du volume requis pour les analyses d'acides aminés. Cette méthode consiste à minéraliser la matière organique en sel d'ammonium, puis de transformer l'ammonium en ammoniac par distillation à la soude. L'ammoniac est finalement dosé avec une solution acide en présence d'un indice coloré. Le pH des surnageants de *T. harzianum* a été ajusté à 3 par addition d'HCl au moment du prélèvement afin de préserver l'azote sous forme d'ammoniac qui peut y être présent.

Une fois la concentration en azote déterminée, le calcul est fait selon la formule suivante pour avoir un minimum de 10 mg d'azote total dans l'échantillon :

$$\text{Volume requis} = \frac{\text{Masse requise}}{\text{Concentration d'azote total}}$$

Volume requis en L

Masse requise en g

Concentration d'azote total en g.L⁻¹

Puisque le milieu de culture contient de l'azote minéral sous forme de nitrate qui peut interférer dans le dosage d'azote total, une fois et demie le volume requis est placé dans une bouteille en verre de 250 mL pyrolysée sur la nuit. Les échantillons sont congelés 24 h à -20 °C puis traités à l'azote liquide pour éviter la formation de mousse pendant la lyophilisation. Cette dernière technique est utilisée ensuite pour les sécher et les récupérer sous forme de poudre (lyophilisateur Delta 1-24 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Allemagne). Le séchage des échantillons est nécessaire pour éviter la dilution de l'acide lors de l'hydrolyse des acides aminés. Ainsi, pour effectuer l'hydrolyse acide, 10 mL d'acide chlorhydrique 6N amendé de 0,1 % de phénol (v/v) sont ajoutés au produit lyophilisé, la bouteille est hermétiquement fermée et incubée 24 h à 110 °C. Puis, les bouteilles sont refroidies pendant 30 min à température ambiante et 100 µL du standard interne composé de 1 % d'acide aminobutyrique (Sigma Aldrich, Etats-Unis) dans 0,1 N d'acide chlorhydrique, y sont ajoutés. Un volume de 2,5 mL de la solution finale est filtré à travers des filtres seringues à membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de 0,45 et 0,22 µm successivement. Le produit filtré est dilué 20 fois et 10 µL sont mélangés avec 70 µL d'un tampon borate (3 % acide borique H₃BO₃, 3,26 % d'hydroxyde de potassium KOH, pH = 10,4 ajusté avec l'acide orthophosphorique) et 20 µL d'un tampon 2A (kit de dérivation AccQ-Fluor™, Waters, Milford, Etats-Unis). Le mélange est ensuite incubé 1 min à température ambiante, suivi d'une incubation de 10 min à 55 °C, avant d'être analysé par HPLC (Waters Alliance, Milford, Massachusetts, Etats-Unis) couplé à un détecteur de fluorescence (excitation 250 nm / émission 395 nm). Un standard d'acide aminé H (ThermoScientific,

Rochester, Etats-Unis) constitué d'un mélange de 18 acides aminés est parallèlement dosé pour identifier et quantifier les acides aminés des échantillons testés. La colonne utilisée est une ACCQ-Tag™ de diamètre de 3,9 mm et de longueur de 150 mm, spécifique pour l'analyse des hydrolysats d'acides aminés (Waters, Milford, Massachusetts, Etats-Unis). Les informations relatives aux paramètres de l'HPLC sont présentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Les paramètres d'élution des hydrolysats d'acides aminés par HPLC

Paramètres	Acides aminés totaux			Acides aminés soufrés		
Volume d'injection	5 µl					
Débit	1 ml.min ⁻¹					
Température de la colonne	37 °C			31 °C		
Solvants	A : H ₂ O B : 10 % (v/v) tampon ACCQ-Tag™ C: Acétonitrile			A : H ₂ O B : 10 % (v/v) tampon ACCQ-Tag™ (pH ajusté à 5.1 avec 1 M de NaOH) C: Acétonitrile		
Gradient						
Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B	% Solvant C	% Solvant A	% Solvant B	% Solvant C
Initial	0	100	0	0	100	0
0,5	0	99	1	0	99	1
18	0	95	5	0	97	3
19	0	91	9	0	92	8
29,5	0	83	17	0	81	19
33	40	0	60	40	0	60
36	0	100	0	0	100	0
65 → 100	40	0	60	40	0	60

7. Quantification des biomasses des différentes souches en coculture par qPCR

En coculture, il est difficile de quantifier les biomasses des différentes souches en se basant sur des paramètres conventionnels telle que la masse sèche. Il s'avère impossible de séparer les biomasses fongiques et bactériennes sans perte, ce qui peut fausser la quantification. Pour cette raison, une méthode basée sur la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) a été développée.

7.1. Relation matière fraîche – matière sèche

Pour exprimer la quantité d'ADN déterminée à l'issue de la qPCR par matière sèche, une relation doit être établie entre celle-ci et la matière fraîche puisque ce n'est pas

possible de déterminer directement la masse sèche (Ms) des échantillons qui vont subir l'extraction d'ADN. Des cultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 de 24 h dans du TY sont utilisées. Pour le champignon, la biomasse est récupérée par centrifugation. Différentes masses fraîches (Mf) en provenance de la même culture sont pesées. Pour la bactérie, plusieurs volumes sont prélevés et leur Mf est déterminée. Pour chaque souche, 5 points de Mf différentes sont pris. La Ms de tous ces échantillons est ultérieurement mesurée et une courbe de calibration est établie. La corrélation de la matière sèche à celle de la biomasse a généré deux équations qui permettront la conversion entre ces deux paramètres (**Figure 20** : (A) Corrélation entre la matière fraîche et la matière sèche de *B. velezensis* et *T. harzianum* issus de monocultures dans le milieu TY, (B) Corrélation entre la matière fraîche de ces mêmes microorganismes et la concentration d'ADN extrait avec le kit Fungi/Yeast genomic DNA isolation et dosé avec le Qubit 3.0 **Figure 20A**) :

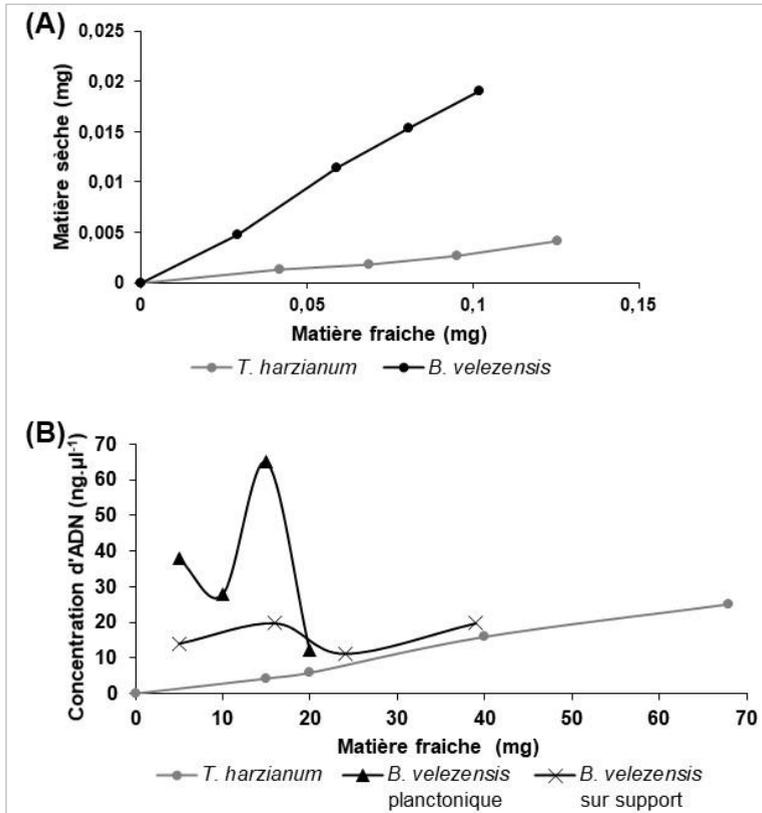


Figure 20 : (A) Corrélation entre la matière fraîche et la matière sèche de *B. velezensis* et *T. harzianum* issus de monocultures dans le milieu TY, (B) Corrélation entre la matière fraîche de ces mêmes microorganismes et la concentration d'ADN extrait avec le kit Fungi/Yeast genomic DNA isolation et dosé avec le Qubit 3.0

Pour *B. velezensis* : Matière sèche (mg) = 0,1905*Biomasse (mg)

Pour *T. harzianum* : Matière sèche (mg) = 0,0311*Biomasse (mg)

7.2. *Extraction de l'ADN*

Pour extraire l'ADN des souches, une technique doit être mise au point pour permettre une bonne extraction des souches appartenant à des règnes différents. Deux kits d'extractions d'ADN sont testés sur des monocultures en condition planctonique.

7.2.1. **Extraction avec le kit GeneJet genomic DNA purification**

Les premiers essais d'extraction d'ADN sont faits avec le kit GeneJet genomic DNA purification (Thermoscientific Molecular Biology). Des échantillons sont prélevés des monocultures de *B. velezensis* et *T. harzianum* et centrifugés 5 min à 8000 x g. Le surnageant est éliminé. Dans le tube contenant le culot (la biomasse), 360 µL de la solution de digestion ainsi que 20 µL de protéinase K sont ajoutés afin d'éliminer les enzymes susceptibles de dégrader l'ADN. Le mélange est transféré dans un tube de 2 mL spécifique à l'usage d'un dismembrateur qui contient 100 µL de billes de verre. Les tubes sont mixés 1 min à 2000 rpm dans un Mikro-Dismembrator (Sartorius, Allemagne), puis incubés 15 min à 56 °C avant d'être mixés de nouveau. Ensuite, 400 µL de tampon de lyse sont ajoutés dans les tubes qui sont réincubés 10 min à 56 °C. Afin de dégrader les ARN pouvant interférer dans l'échantillon, 20 µL d'ARNase y sont ajoutés, les tubes sont vortexés et incubés 10 min à température ambiante. Toutes les impuretés sont ensuite éliminées par 2 minutes de centrifugation à 10000 x g. Les débris cellulaires, les protéines et l'ARN vont se déposer au fond du tube et l'ADN restera en suspension. L'ADN est ensuite précipité par ajout de l'éthanol 50 % sur la phase liquide récupérée du tube dans un ratio de 1 : 1 (450 µL d'éthanol pour 450 µL de surnageant). La purification de l'ADN se fait sur colonne déposée dans un tube de collection avec une première étape de fixation (le mélange surnageant – éthanol est déposé sur la colonne et le tout est centrifugé 1 min à 6000 x g, le perméat dans le tube de collection est éliminé), une seconde étape de lavage (2 étapes successives avec 500 µL des tampons de lavage respectivement et par centrifugation 1 min à 8000 x g, suivie par une étape de centrifugation de 1 min à 12000 x g pour éliminer les résidus de l'éthanol dans les solutions tampons, le perméat dans le tube de collection est éliminé à chaque étape). Finalement, la colonne est placée dans un nouveau tube (Eppendorf de 1,5 mL) pour éluer l'ADN avec 100 µL de tampon d'élution. Après ajout du tampon, une incubation de 2 min est réalisée avant de centrifuger l'échantillon (1 min à 8000 x g). Pour s'assurer que la totalité de l'ADN fixé sur la membrane de la colonne est éluee, l'éluat peut être repassée de nouveau sur la même colonne.

7.2.2. **Extraction avec le kit Fungi/Yeast genomic DNA isolation**

Pour optimiser l'extraction de l'ADN, un second kit acquis chez Norgen Biotek est testé. Le principe est similaire au premier kit. Une première étape de lyse cellulaire avec le tampon préconisé par le kit et des billes de verre consiste à libérer l'ADN des cellules. Les débris sont ensuite éliminés par centrifugation (2 min à 14000 x g) et l'ADN précipité avec de l'éthanol 96 – 100 %. La purification est également faite sur

colonne avec fixation de l'ADN, suivie par des lavages de la membrane et enfin une élution avec les solutions proposées dans le kit.

7.2.3. Quantification de l'ADN

La quantité d'ADN extraite par les différents kits est déterminée avec le Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsband, Californie, Etats-Unis). Ce dosage fluorimétrique consiste à mélanger dans le tampon fourni dans le kit un réactif fluorescent qui a des propriétés d'intercalant et 1 μL de l'échantillon d'ADN. La quantification est ensuite réalisée avec un fluoromètre (Invitrogen, Carlsband, CA, Etats-Unis) qui mesure l'absorbance à 260 nm.

7.2.4. Vérification de la qualité de l'ADN

L'intégrité de l'ADN est contrôlée sur gel agarose à 0,8 % (0,8 g d'agarose dans 100 mL de tampon TAE (40 mM Tris – Acétate et 1 mM EDTA). Pour marquer les acides nucléiques, 5 μL du colorant Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Allemagne) sont ajoutés au gel avant de le couler dans le moule. La migration sur le gel de l'ADN mélangé à 20 % du tampon de charge Orange Loading Dye (Promega, Madison, États-Unis) est faite par électrophorèse (Électrophorèse RunOne, VWR) pendant 25 min à 100 V. Vu la grande taille de l'ADN génomique et l'impertinence de l'estimer avec un marqueur de taille, celui-ci est utilisé uniquement comme témoin du bon déroulement de l'électrophorèse (Smartladder, Eurogentech, Belgique). Le profil de migration est observé avec un trans-illuminateur UV (GenoSmart, VWR).

7.3. Relation matière fraîche – quantité d'ADN

Une droite de calibration entre la quantité d'ADN extraite et la matière fraîche doit être créée afin de vérifier la reproductibilité de l'extraction d'ADN en fonction de la biomasse de départ. Différents échantillons provenant des monocultures de *B. velezensis* et *T. harzianum* sur support et de masse déterminée ont servi pour l'extraction d'ADN. Pour la monoculture de *B. velezensis*, des échantillons sont prélevés de la phase planctonique et immobilisée sur le support. Des extractions à partir de 4 échantillons de masses différentes sont faites dans le but d'établir cette droite (**Figure 20B**). Une équation a permis de corrélérer la concentration d'ADN à la biomasse fongique :

$$\text{Concentration d'ADN (ng.}\mu\text{L}^{-1}) = 0,3702 * \text{Biomasse (mg)}$$

En revanche, l'extraction de *B. velezensis* n'est pas complètement reproductible puisque la concentration d'ADN obtenue n'est pas proportionnelle à la biomasse traitée.

7.4. Design des amorces pour *T. harzianum*

Pour l'amplification de *T. harzianum* par qPCR, des amorces spécifiques à ce champignon doivent être conçues. L'espaceur interne transcrite (ou « internal transcribed spacer » ITS) est la région la plus évidente à cibler pour le choix des

amorces. C'est une région universelle pour les champignons mais très polymorphe. Des amorces universelles existent déjà, mais ne sont pas spécifiques à cette souche.

Dans un premier temps, les ITS de *T. harzianum* sont amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec les amorces ITS1 et ITS4 présentées dans le **Tableau 8A**, en utilisant l'ADN polymérase Q5® High-Fidelity (New England Biolabs, Beverly, États-Unis) qui a une fidélité supérieure à celle de la Taq ADN polymérase. L'enzyme est mélangée avec l'ADN, les amorces, les nucléotides dans un tampon selon les quantités présentées dans le **Tableau 8B**. L'amplification est réalisée en 30 cycles décrits dans le **Tableau 8C**.

Tableau 8 : Paramètres d'amplification PCR du gène ITS : (A) les amorces utilisées, (B) la composition du mix de réaction, (C) les cycles PCR

A			B		
Nom	Séquence 5'–3'	T _m (°C)	Elément	Concentration initiale	Volume
ITS1	tccgtaggtgaacctgcgg	57	Tampon Q5	5 x	10 µl
ITS4	tcctccgcttattgatatgc	53	Q5® ADN polymerase	100 x	0,5 µl
C			dNTP	20 mM	0,5 µl
			Amorce sens	10 µM	2,5 µl
Phase	Température	Temps	Amorce anti - sens	10 µM	2,5 µl
Dénaturation initiale	95 °C	30 sec	ADN	≈ 50 ng.µl ⁻¹	1 µl
Dénaturation	95 °C	30 sec	H ₂ O	-	Qsp 50 µl
Hybridation	60 °C	1 min			
Elongation	68 °C	1 min/kb			
Extension finale	68 °C	5 mins			
Maintien	4 °C	--			

Le produit de la PCR est déposé sur gel agarose pour migration comme décrit ci-dessus. La bande d'ADN est découpée avec un scalpel et l'ADN est purifié avec le kit GeneJetGel extraction (Thermoscientific Molecular Biology). Le gel d'agarose est fondu dans un tampon de fixation à 60 °C pendant une dizaine de minutes. L'ADN est élué sur colonne, dosé avec le kit Qubit 3.0, puis envoyé pour séquençage à la société Eurogentec.

La séquence de l'ADN est téléchargée sur le site primer3web 4.0.0 (https://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm) afin de générer le meilleur couple d'amorces. Ainsi, le couple d'amorces conçu spécifiquement aux ITS de ce champignon est :

TrITS F_w : cgtcatttcaaccctcgaac
TrITS R_v : cctacctgatccgaggtaac

L'efficacité des amorces à s'hybrider et amplifier les régions ITS de *T. harzianum* a été vérifiée sur gel après amplification PCR de son génome à l'aide de ces amorces. Une bande d'ADN d'une taille de 700 paires de base approximativement a été observée sur gel agarose permettant ainsi de valider l'utilisation de ces amorces pour les analyses ultérieures.

La spécificité du couple des amorces synthétisées est vérifiée par une PCR sur l'ADN de *T. harzianum*, en suivant le même protocole décrit ci-dessus (même mix et cycles de PCR décrit respectivement dans les **Tableau 8B et C**) avec les nouvelles

amorces. Après amplification, l'échantillon est mélangé avec du tampon de charge et déposé sur gel agarose pour visualisation. Si les amorces sont correctes, elles s'hybrident efficacement à l'ADN de *T. harzianum* et l'amplifient, générant une bande d'ADN sur le gel.

7.5. Vérification de la spécificité des amorces vis-à-vis de chaque souche

Des tests préliminaires sont essentiels pour contrôler la qualité de la qPCR. Dans un premier temps, la spécificité des amorces d'une souche envers l'autre a été testée. Des mix de PCR avec l'ADN de *T. harzianum* et les amorces spécifiques du génome de *Bacillus* ou l'ADN de *B. velezensis* avec les amorces des ITS sont préparés pour étudier la spécificité des amorces vis-à-vis de l'espèce opposée. Si une amplification d'ADN est observée, les amorces ne sont alors pas adaptées pour quantifier l'ADN d'une souche dans un mélange d'ADN des 2 souches. Conséquemment, d'autres amorces doivent être synthétisées.

Les amorces spécifiques du gène de la gyrase de *B. velezensis* S499 sont utilisées pour l'hybridation au génome de la bactérie (**Tableau 9A**).

Tableau 9 : Paramètres de la qPCR pour la quantification de l'ADN génomique : (A) les amorces de la gyrase utilisées, (B) la composition du mix de réaction, (C) les cycles qPCR

A			B		
Nom	Séquence 5' – 3'	T _m (°C)	Elément	Concentration initiale	Volume
QGyr Fw	gagacgcactgaaatcgtga	57,2	FastGene mix	2 x	10 µl
QGyr Rv	gccgggagacgtttaacata	57,2	Scriptase	20 x	1 µl
C			Amorce sens	10 µM	0,8 µl
Dénaturation initiale	95 °C	2 mins	Amorce anti - sens	10 µM	0,8 µl
Dénaturation	95 °C	5 sec	ADN	≈ 50 ng.µl ⁻¹	1 µl
Hybridation - élongation	60 °C	30 sec	H ₂ O	-	Qsp 20 µl
Courbe de fusion	Gradient 60 - 95 °C	1 min			

Des tests de spécificité ont été effectués avec l'ADN de la souche GA1 comme décrit dans la section 7.5.

Ensuite, la spécificité de ces amorces uniquement vis-à-vis de *B. velezensis* et non de *T. harzianum* a été vérifiée. Ce résultat est fourni par la courbe de fusion générée après l'amplification, qui montre que les pics relatifs à une synthèse d'ADN double brin à la suite d'une hybridation spécifique avec les amorces sortent à la même température (température de fusion = 86,01 °C). Toutes les hybridations non spécifiques sont caractérisées par des pics d'amplitude plus faible, qui sortent à d'autres températures. La **Figure 21A** montre en gris les courbes correspondant à l'amplification du gène de la gyrase chez *B. velezensis* GA1, en rouge chez *T. harzianum* IHEM5437 et en jaune la courbe obtenue avec le témoin négatif (H₂O).

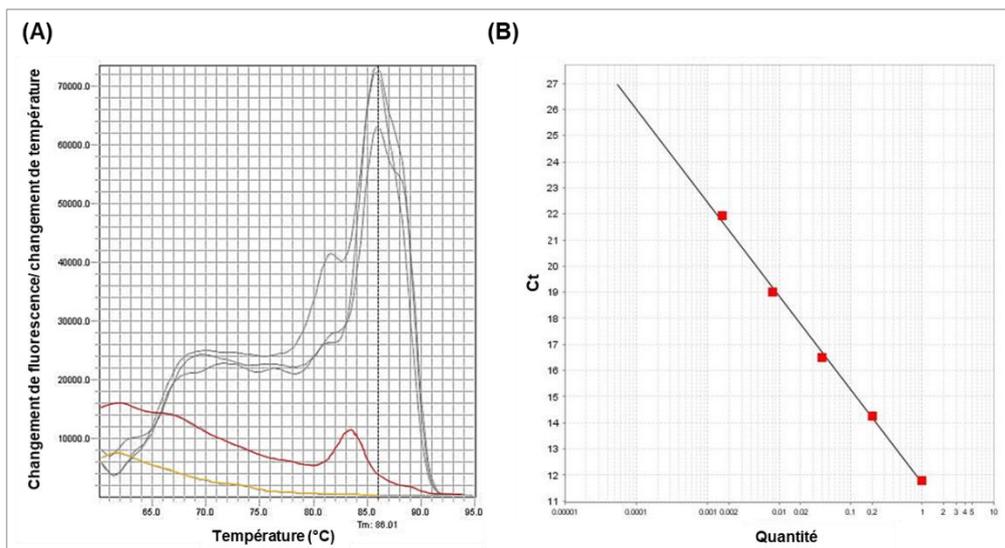


Figure 21 : (A) Courbe de fusion pour les amplifications par qPCR réalisées sur les génomes de *B. velezensis* GA1 (gris) et *T. harzianum* IHEM5437 (rouge) avec les amorces de la gyrase de *B. velezensis* S499 (*QGyr*), (B) Courbe standard des Ct obtenus pour différentes concentrations d'ADN de *B. velezensis* GA1, diluées de 5 en 5

La spécificité de ces amorces envers le gène de la gyrase uniquement chez *B. velezensis* a été validée, à la suite de l'absence de synthèse d'ADN double brin chez *T. harzianum*, mais des hybridations non spécifiques ont été observées.

Les mêmes expériences effectuées dans le cadre de l'étude de la spécificité des amorces de la gyrase pour la souche GA1 ainsi que la proportionnalité de l'amplification par qPCR et la quantité d'ADN utilisée sont réalisées pour *T. harzianum* IHEM5437 et ses amorces. La spécificité des nouvelles amorces amplifiant les régions ITS est validée par l'absence de signal correspondant à une hybridation spécifique et une amplification de séquences génétiques chez *B. velezensis* GA1 (**Figure 22A**). Toutefois, des hybridations non spécifiques des amorces sont observées sur cette même figure.

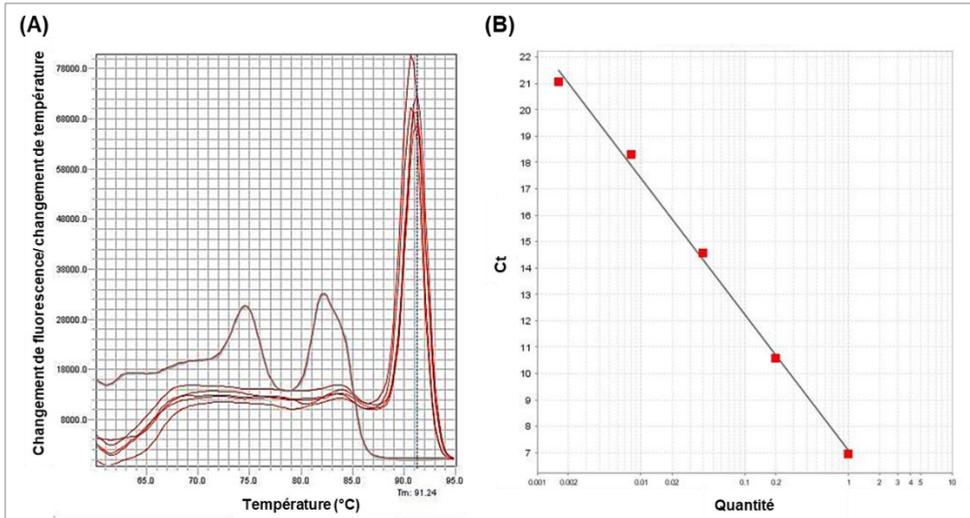


Figure 22 : (A) Courbe de fusion pour les amplifications par qPCR réalisées sur les génomes de *T. harzianum* IHEM5437 (rouge) et de *B. velezensis* GA1 (gris) avec les amorces des régions ITS de *T. harzianum* IHEM5437, (B) Courbe standard des Ct obtenus pour différentes concentrations d'ADN de *T. harzianum*, diluées de 5 en 5

7.6. Quantification des biomasses par qPCR

Avant de pouvoir utiliser la technique de la qPCR pour quantifier les biomasses dans un biofilm mixte, il est primordial de vérifier la proportionnalité du résultat de la qPCR à la concentration d'ADN de l'échantillon. En effet, la qPCR est une technique qui permet de quantifier l'ADN d'un échantillon en suivant l'amplification d'un signal fluorescent, corrélée à la concentration du matériel génomique. Une sonde fluorescente est ajoutée dans le mélange réactionnel. Cette sonde s'hybride à l'ADN et son signal est ainsi amplifié dans les mêmes ratios au cours des cycles de la qPCR. Une plus grande quantité d'ADN de départ mène à atteindre un niveau de fluorescence déterminé en moins de cycles qu'une plus faible quantité. Le nombre de cycle nécessaire pour atteindre ce niveau est qualifié de valeur Ct. En d'autres termes, le Ct est le nombre de cycles nécessaires pour arriver au seuil de détection de fluorescence. Pour des Ct inférieurs à 30, le transcrite est considéré présent dans l'échantillon. Les Ct supérieurs à 30 reflètent alors l'absence d'une séquence reconnue et amplifiée par les amorces utilisées [355].

Dans le cadre de cette étude, le SYBR® Green est la sonde fluorescente utilisée. Elle est incluse dans le kit Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB, Beverly MA, Etats-Unis) qui contient aussi le tampon pour le mélange réactionnel. Les composants de ce dernier sont repris dans le **Tableau 9B**. La fluorescence est détectée par le thermocycleur StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-Unis). Comme pour la PCR, la qPCR comprend plusieurs cycles afin d'amplifier le matériel génétique de départ. Ces cycles sont repris dans le **Tableau 9C**. Lors du dernier cycle, la courbe de fusion est générée et permet de

vérifier la spécificité des amorces. Si elles sont spécifiques d'un seul amplicon et qu'aucune hybridation entre les amorces ne s'est établie, la courbe sera unimodale. Le pic obtenu correspond à la température de fusion de l'ADN amplifié.

Différentes concentrations d'ADN de chaque souche sont préparées (préférentiellement des dilutions en série de 1/5). La proportionnalité entre les Ct et les concentrations des différents échantillons permettra de déterminer la spécificité des amorces vis-à-vis de l'ADN cible. Pour *B. velezensis*, les quantités d'ADN testées sont 0,2, 1, 5, 25 et 100 ng. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une concentration d'ADN détectable pour chacun de ces échantillons doit ainsi varier avec une différence constante, proportionnelle au facteur de dilution constant. La **Figure 21B** qui représente la courbe standard, montre que l'amplification par qPCR du gène de la gyrase chez *B. velezensis* GA1 est bien proportionnelle à la quantité d'ADN utilisée (sur l'axe des abscisses de la **Figure 21B** la quantité 1 correspond à la quantité maximale d'ADN utilisée : 100 ng). Trois Ct supplémentaires sont nécessaires pour détecter des quantités d'ADN 5 fois plus petites. De même pour *T. harzianum* IHEM5437, la proportionnalité de la valeur de Ct à la quantité d'ADN initiale (0,2, 1, 5, 25 et 100 ng) a été confirmée par la courbe standard où 3 Ct additionnels sont constatés pour chaque dilution d'un facteur 5 (**Figure 22B**).

Une dernière expérience de vérification de l'efficacité de cette méthode pour la quantification de la biomasse respective de chaque souche dans un mélange de celles-ci consiste à analyser un mélange de biomasse de poids connus de ces deux microorganismes provenant de monocultures. La composition des différents mélanges ainsi que la concentration d'ADN extrait sont présentées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Concentration d'ADN (ng par μ l) extrait d'un mélange de différentes biomasses (en mg) de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437

Echantillon	Biomasse de <i>B. velezensis</i> (mg)	Biomasse de <i>T. harzianum</i> (mg)	Concentration d'ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
A	17	34	35,8
B	21	12	29,2
C	30	21	39
D	5	54	20,8

En considérant que la concentration d'ADN de *T. harzianum* peut être déduite par la formule établie dans la section 7.3, la part de *B. velezensis* est alors calculée en retranchant la concentration d'ADN respectif à *T. harzianum* de la concentration totale. Une certaine proportionnalité entre la biomasse de *B. velezensis* et la quantité d'ADN obtenue est observée (**Figure 23**).

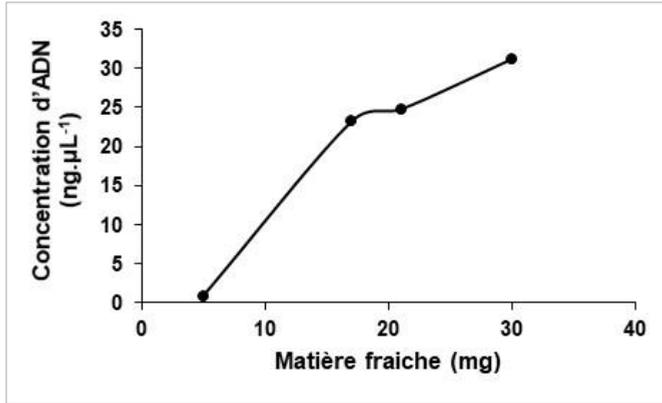


Figure 23 : Concentration d'ADN (en ng par μL) de *B. velezensis* calculée dans le mélange de biomasse (en mg) de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437

L'extraction de l'ADN total a été suivie par des analyses qPCR avec l'une ou l'autre des amorces, avec de l'ADN fongique et bactériens isolés comme témoin négatifs. Des contaminations sont constatées dans les contrôles (présence d'amplification dans le génome de *T. harzianum* avec les amorces de la gyrase et vice versa). Le même problème est rencontré quand un mélange d'ADN de concentration déterminée provenant de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* séparément est utilisé. Les résultats ne permettent donc pas de quantifier correctement un échantillon en condition réelle, la biomasse immobilisée a été par la suite quantifiée en totalité sans pouvoir distinguer une espèce de l'autre.

8. Etude de l'expression des gènes de synthétases de lipopeptides par RT-qPCR

Comme les lipopeptides constituent l'élément d'évaluation de l'effet de l'interaction, il s'avère essentiel de suivre l'effet des différents milieux de culture ainsi que de la coculture sur l'expression des gènes des synthétases de ces lipopeptides. Le taux d'expression est suivi par RT-qPCR suite à des extractions d'ARN dans différentes conditions de cultures décrites dans les sections précédentes :

- *B. velezensis* GA1 dans TY
- *B. velezensis* GA1 dans MN supplémenté avec 90 % du surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 dans MN
- *B. velezensis* GA1 en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans MN

8.1. Extraction d'ARN

Plusieurs kits ont été utilisés afin d'optimiser l'extraction d'ARN de la souche : NucleoSpin® RNA Set for NucleoZol, NucleoSpin® RNA Plus, NucleoSpin® RNA Midi (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

L'extraction d'ARN est effectuée selon la procédure préconisée par chaque kit. La première phase de lyse est celle qui diffère d'un kit à l'autre. Pour le kit NucleoSpin® RNA Set for NucleoZol, le NucleoZol est utilisé pour la lyse des cellules. Ce réactif remplace l'utilisation du chloroforme nocif et garantit l'extraction des ARN de toutes les tailles. Pour les autres kits, le lysozyme est utilisé pour dégrader les parois cellulaires et libérer les composants intracellulaires.

Un essai d'extraction a également été réalisé en suivant le protocole détaillé dans les travaux de Villa-Rodríguez *et al.* (2018) [356]. Celui-ci consiste à lyser les cellules en utilisant le lysozyme couplé à l'utilisation du TRIzol – chloroforme.

Plusieurs essais d'optimisation des protocoles sont étudiés afin d'améliorer la stabilité de l'ARN et l'efficacité de la lyse cellulaire. Pour garantir que l'ARN extrait ne soit pas dégradé en partie ou en totalité, les cellules sont directement placées dans du RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, États-Unis), une solution qui stabilise l'ARN et qui permet de le garder intact pendant des heures à température ambiante et des jours à 4 °C. La quantité de transcrits, proportionnelle au niveau d'expression des gènes, est ainsi conservée. L'amélioration de la lyse cellulaire est réalisée par plusieurs moyens. Dans un premier temps, un broyage des cellules à l'azote liquide facilite la lyse des parois cellulaires. Dans un second temps, différentes conditions de lyse avec le lysozyme sont testées en suivant les instructions proposées dans l'étude de Guez *et al.* (2009) [357]. Le temps d'incubation dans le lysozyme et l'intensité d'agitation sont alors fixés à 10 min d'incubation et 10 min d'agitation avec des billes respectivement.

À l'issue de ces étapes d'optimisation, un protocole adapté à l'extraction de l'ARN total de *B. velezensis* GA1 a été mis au point. Des prélèvements sont effectués chaque 4 h pendant la phase exponentielle de croissance (pour les monocultures de *B. velezensis*). Les cellules sont récupérées par centrifugation de 2 minutes à 8000 x g, le surnageant est écarté. Le culot de bactéries est suspendu dans 400 µL de RNAlater.

Le mélange est incubé 24 h à 4 °C pour permettre au RNAlater de pénétrer la cellule, puis à -80 °C jusqu'à l'extraction. La DO_{600nm} est mesurée lors de chaque prélèvement pour permettre de déterminer précisément la phase de croissance des cellules et sélectionner les échantillons les plus judicieux à l'extraction. Afin de débiter l'extraction, les cellules sont récupérées par centrifugation de 10 min à 10000 x g. Puisque le RNAlater est visqueux, une force de centrifugation plus puissante est nécessaire pour réussir à déposer les cellules au fond du tube, sans pour autant affecter l'intégrité de l'ARN stabilisé. Le surnageant est éliminé. Le culot est suspendu dans 100 µL de solution de lysozyme à 10 g. L⁻¹ solubilisé dans un tampon TE (10 mM Tris – 1 mM EDTA) et incubé 10 min à 37 °C. Ensuite, 350 µL du tampon de lyse et 3,5 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés au mélange pour achever la lyse des cellules. Les débris cellulaires et les protéines sont ensuite éliminés par filtration sur colonne. De l'éthanol 70 % est utilisé pour la précipitation du matériel génétique qui est ensuite élué sur colonne selon les instructions du fabricant. Son élution est précédée par une étape de dessalement et de dégradation de l'ADN en ajoutant de la DNase diluée dans son tampon d'activation.

8.2. Quantification de l'ARN et vérification de sa qualité

La concentration d'ARN dans les échantillons est dosée par méthode de spectrophotométrie en utilisant le Nanodrop 2000® (Wilmington, États-Unis). Des concentrations d'ARN allant de 445 à 1210 ng.µL⁻¹ ont été obtenues à partir des échantillons bactériens collectés (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Concentration d'ARN (en ng par µl) extrait des cellules de *B. velezensis* GA1 en monoculture dans le milieu TY et dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 issu d'une culture de 144 h et en coculture avec *T. harzianum* dans le MN

Condition	Concentration d'ARN (ng.µL ⁻¹)
Monoculture dans TY t16	812
Monoculture dans TY t20	1176
Monoculture dans TY t24	1210
Monoculture dans MN + 90 % surnageant t20	688
Monoculture dans MN + 90 % surnageant t24	970
Monoculture dans MN + 90 % surnageant t28	718
Coculture dans MN t144	445
Coculture dans MN t168	578

Par la suite, les extraits d'ARN ont été dilués pour avoir une concentration finale de 50 ng.µL⁻¹. Quant à la qualité de l'ARN, elle a été vérifiée sur gel agarose par électrophorèse comme mentionné dans la section 7.2.4. Pour qualifier l'ARN de bonne qualité, un smear correspondant à la diffusion de l'ARN doit apparaître avec 2 bandes plus intenses renfermant les ARN ribosomiaux.

Pour les conditions sélectionnées, les bactéries ont été récupérées par centrifugation et l'ARN a été stabilisé par l'ajout de RNAlater. Bien que les premiers essais n'aient pas permis d'obtenir une qualité d'ARN suffisante (pas de visualisation des deux bandes correspondantes aux ARN ribosomiques), le kit NucleoSpin® RNA Midi a montré la meilleure efficacité quant au rendement d'extraction obtenu (**Figure 24**). Ce kit a donc été utilisé par la suite pour les extractions d'ARN.

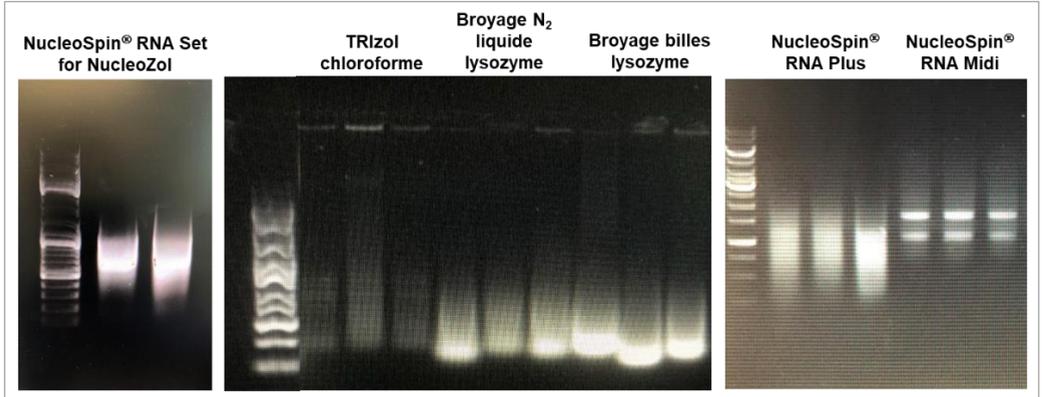


Figure 24 : Vérification sur gel de la qualité de l'ARN extrait des cellules de *B. velezensis* GA1 issues d'une monoculture de 24 h dans le milieu TY après extraction avec plusieurs kits utilisant différentes méthodes de lyse

8.3. Expression des gènes par RT-qPCR

Le taux d'expression des gènes des synthétases de surfactine, fengycine et iturine a été suivi par RT-qPCR. La normalisation de l'expression est faite en se référant au gène de la gyrase comme décrit ci-dessous. Les échantillons sélectionnés selon la phase de croissance de *B. velezensis* sont analysés.

Les amorces utilisées, en plus de celles de la gyrase, sont décrites dans le **Tableau 12A**.

Tableau 12 : Paramètres de la RT-qPCR pour quantification de l'ARN : (A) les amorces homologues aux synthétases de lipopeptides utilisées, (B) la composition du mix de réaction, (C) les cycles RT-qPCR

A			B		
Nom	Séquence 5' – 3'	Tm (°C)	Élément	Concentration initiale	Volume
SrfA Fw	attgttacgggtggctctgg	57,1	Luna Universal mix réactionnel	2 x	10 µl
SrfA Rv	cgctgcgatagtcaaaatca	54,8	Luna WarmStart mix enzyme	20 x	1 µl
ItuC Fw	caagaagctctcgttacggc	57,9	Amorce sens	10 µM	0,8 µl
ItuC Rv	gattgccgggtgagatttccc	57,9	Amorce anti - sens	10 µM	0,8 µl
FenC Fw	ctgaatctcttgcgcatgt	56,9	ARN	≈ 50 ng.µl ⁻¹	1 µl
FenC Rv	tgatctcgtgctcctca	56,9	H ₂ O	-	Qsp 20 µl

C		
Phase	Température	Temps
Transcription inverse	55 °C	10 mins
Dénaturation initiale	95 °C	1 min
Dénaturation	95 °C	10 sec
Extension	60 °C	30 sec
Courbe de fusion	Gradient 60 - 95 °C	1 min

Les amorces des gènes des synthétases de lipopeptides sont spécifiques à différents modules selon le type de la synthétase. Pour la synthétase de surfactine, les amorces sont hybridées à la séquence codant pour le premier module alors que pour les synthétases de fengycine et d'iturine, les amorces ciblent la séquence codant respectivement pour le troisième et le dernier module.

Le kit utilisé pour cette analyse est Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB, Beverly MA, Etats-Unis) qui contient le tampon pour le mélange réactionnel renfermant le SYBR® Green qui est la sonde fluorescente servant à la détection de l'amplification. Le mélange réactionnel pour l'amplification est décrit dans le **Tableau 12B** ainsi que les différents cycles nécessaires (**Tableau 12C**). Un cycle supplémentaire de transcription de l'ARN en ADNc est ajouté au début de l'amplification par rapport à la RT-qPCR de l'ADN. Cette rétrotranscription est effectuée par la reverse transcriptase présente dans le mix d'enzyme. Les courbes de fusion sont contrôlées afin de vérifier la spécificité des amorces et la pureté des échantillons.

Pour comparer les taux d'expression entre les différentes conditions, il est essentiel dans un premier temps de normaliser indirectement la quantité d'ARN, traduite en Ct, par rapport à un gène de référence dont l'expression est stable dans les différentes cultures. Le gène de la gyrase est sélectionné comme référence. Le ΔCt est ainsi calculé selon la formule suivante :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{référence}}$$

$Ct_{\text{échantillon}}$: la valeur Ct obtenue pour le gène d'intérêt (*srf*, *fen* ou *itu*) dans une condition précise

$Ct_{\text{référence}}$: la valeur Ct obtenue pour le gène de référence (*gyr*) dans la même condition

Ensuite, une condition de culture doit être sélectionnée comme référence afin de comparer le taux d'expression dans les autres conditions à celle-ci. La valeur Ct obtenue avec les différentes amorces dans cette condition sera ainsi fixée et le $\Delta\Delta Ct$ calculé :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - (Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{contrôle}})$$

$Ct_{\text{échantillon}}$: la valeur Ct obtenue pour le gène d'intérêt (*srf*, *fen* ou *itu*) dans une condition précise

$Ct_{\text{référence}}$: la valeur Ct obtenue pour le même gène d'intérêt (*srf*, *fen* ou *itu*) dans la condition contrôle

Finalement, le facteur $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est calculé afin de déterminer la variation du nombre de copies du gène d'intérêt par rapport à la condition de contrôle, pour laquelle le facteur $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est égale à 1. Ce facteur est référé par le terme RQ. Cette méthode de double normalisation a été développée par Livak et Schmittgen [358].

9. Méthodes d'analyses bioinformatiques

9.1. Analyse des voies métaboliques par KEGG

Les voies du métabolisme du carbone et de l'azote ont été analysées par la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>). *B. velezensis* FZB42 et *T. reesei* QM6a ont été sélectionnés comme organismes modèles car les souches utilisées dans la présente étude ne figurent pas dans la base de données. Dans la rubrique « Pathway Maps », le métabolisme de l'azote est sélectionné en premier, puis l'organisme est choisi dans la rubrique « Change Pathway Type ». La disponibilité des enzymes requis pour métaboliser différentes formes d'azote : le nitrate, le nitrite et l'ammonium est examinée.

9.2. Recherche des gènes d'intérêts par BLAST

Pour la confirmation des résultats de l'absence ou de la présence de l'enzyme nitrite réductase NirA, responsable de la réduction du nitrite en ammonium, chez les souches de *Bacillus*, une analyse BLAST entre le gène codant cette enzyme (récupérable sur le site KEGG) et le génome entier de *B. velezensis* GA1 a été réalisée.

10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio 1.1.423 (version en langage R 4.03). Un test de t de Student ou un test de Mann-Whitney sont adoptés pour des comparaison entre 2 valeurs. Les groupes sont considérés significativement différents à une valeur-p inférieure à 0,05. Pour les comparaisons multiples, une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) et un test de Tuckey, test de la différence franchement significative (HSD) ont été effectués. Les groupes avec différentes lettres sont considérés significativement différents à une valeur- α inférieure à 0,05.

Chapitre 3

Résultats

1. Croissance de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu riche TY

Les études bibliographiques sur les exigences de croissances de *Bacillus* et *Trichoderma* ont permis de déterminer la température et le pH optimal pour la culture des deux espèces. Ces paramètres ont été fixés respectivement à 30 °C et 6,5. Le milieu TY enrichi a été sélectionné pour les différentes cultures, sur base de recherches bibliographiques qui ont démontré la capacité de ces deux microorganismes de s'y développer.

Ces conditions ont été validées par la culture en condition planctonique de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437, séparément dans un premier temps. Après 24 h d'incubation à une agitation de 120 rpm, la culture de *Bacillus* a atteint une $DO_{600nm} = 4,77 \pm 0,53$ et celle de *T. harzianum* une masse sèche de 79 mg dans 100 mL de culture. Ce champignon filamenteux a formé des pellets compacts dispersés dans le milieu.

Un support métallique a été introduit dans les fioles afin de simuler les conditions naturelles dans lesquelles ces microorganismes se développent en formant des biofilms sur un support, tel que les racines. Le champignon a été capable de s'attacher entièrement au support métallique et de coloniser la partie continuellement submergée dans le milieu de culture ou alternativement submergée du fait de l'agitation (**Figure 25A**), formant une biomasse de 85,6 mg après 48 h. Aucune croissance n'est détectée en phase planctonique.

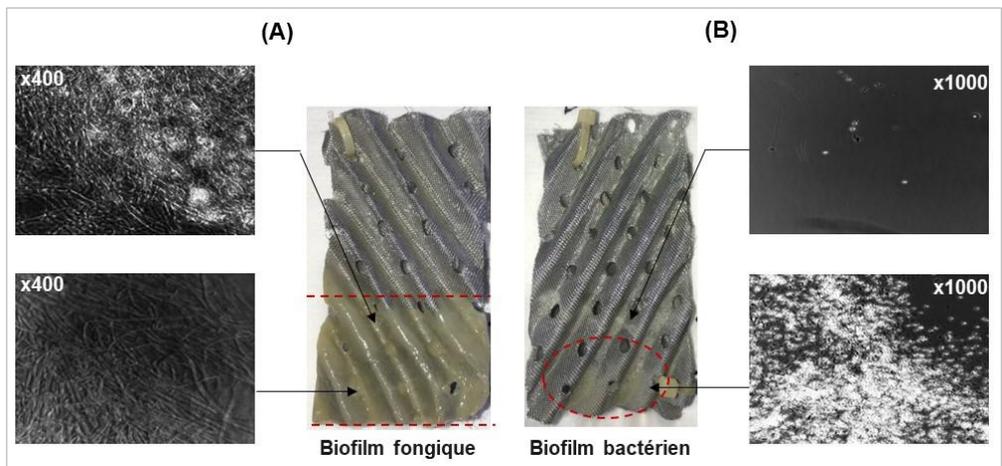


Figure 25 : Observations à l'œil nu et en microscopie optique (avec les grossissements x 400 et x 1000) de l'attachement des biomasses respectives de (A) *T. harzianum* IHEM5437 et (B) *B. velezensis* GA1 sur le support métallique en monoculture dans le milieu TY après 48 h d'incubation à 30 °C

Cependant, l'attachement de la bactérie est moins efficace. La majorité de la population microbienne se multiplie dans la phase liquide de la culture ($DO_{600nm} =$

1,98 ± 0,034) et une faible partie se développe de manière immobilisée sur le support, et plus précisément sur la partie submergée en permanence (**Figure 25B**), avec une masse sèche de 26,1 mg après 48 h. Ces résultats ont été confirmés par des observations microscopiques en microscopie inversée.

1.1. Optimisation de l'attachement sur le support

1.1.1. Optimisation de la vitesse d'agitation

L'agitation des fioles joue un rôle déterminant dans l'attachement des microorganismes sur le support. Trois vitesses d'agitation ont été testées et la masse sèche de la biomasse formée sur le support a été déterminée (**Figure 26**).

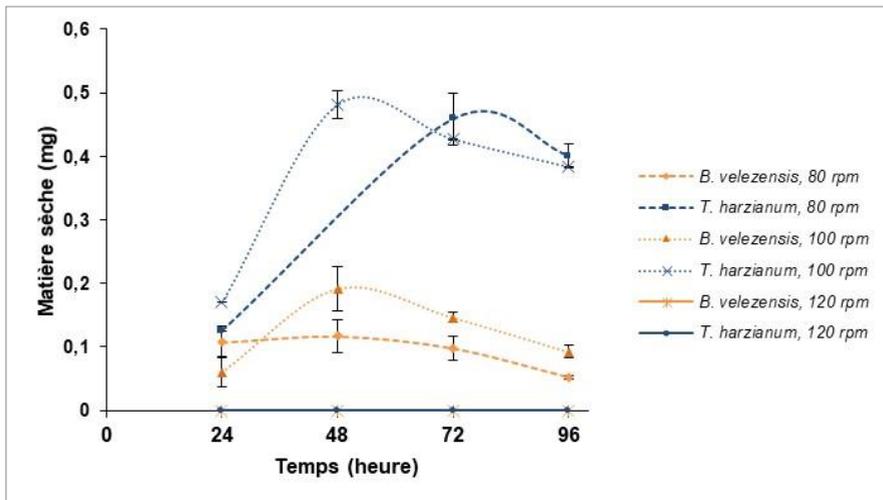


Figure 26 : Suivi de la matière sèche (en mg) des biofilms de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 attachés sur le support métallique en monoculture dans le milieu TY sous différentes vitesses d'agitation (80, 100 et 120 rpm) après 24, 48, 72 et 96 h d'incubation à 30 °C

Pour une vitesse d'agitation de 120 rpm, ni *T. harzianum* ni *B. velezensis* ne sont capables de s'attacher sur le support. Pour le champignon, l'attachement est possible à des niveaux similaires avec une agitation à 80 et 100 rpm. À 80 rpm, la phase d'attachement et de croissance marquée par la phase exponentielle de la courbe est plus lente et s'étale sur 3 jours. A 100 rpm, la plus grande masse sèche est observée après 48 h de culture suivie d'une légère baisse attribuée à la dispersion du biofilm. Ces deux vitesses d'agitation semblent être adéquates à la culture de *T. harzianum* sur support. En ce qui concerne *B. velezensis*, une biomasse plus importante s'accroche au support en agitant à 100 rpm. Cette dernière vitesse a donc été sélectionnée pour les expériences ultérieures en présence du support.

1.1.2. Optimisation du pH

Afin de favoriser l'attachement de *B. velezensis* sur le support métallique, il est intéressant d'étudier l'effet du pH sur la formation de biofilm. En général, les cultures se font sans régulation de pH, dans un milieu de pH initial de 6,5. Un bioréacteur à biofilm à film tombant a permis d'étudier l'effet de la régulation continue du pH à 6,5 sur l'attachement de la souche GA1 sur des disques de support métallique placés dans la colonne dans laquelle le milieu de culture circule en permanence. La masse sèche des biofilms attachés sur la totalité des disques a été calculée. Dans les deux conditions, 0,21 g de masse sèche sont relevés sur les supports (**Figure 27**). La régulation du pH n'a donc pas influencé l'attachement de *B. velezensis*.

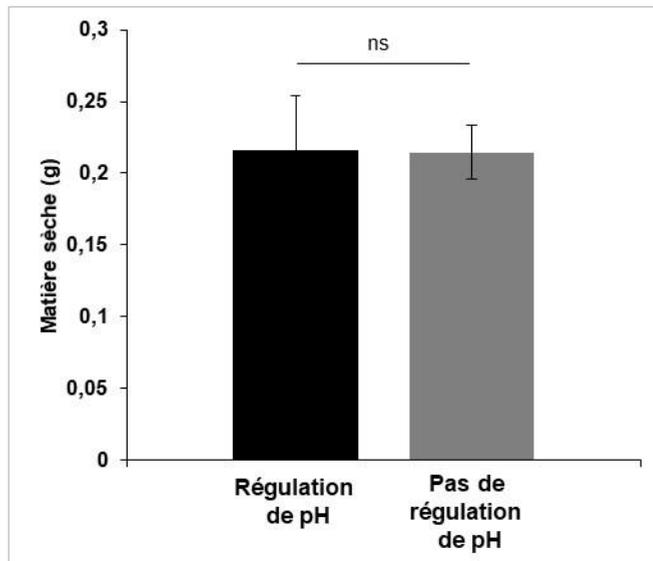


Figure 27 : Matière sèche (en g) du biofilm de *B. velezensis* GA1 attaché sur les 5 disques de support métallique implementés dans un bioréacteur à biofilm à film tombant avec et sans régulation de pH à 6,5 dans le milieu TY après 48 h de culture à 30 °C avec une agitation de 400 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$.

1.2. Coculture de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437

Après avoir déterminé les conditions optimales pour la croissance de ces deux microorganismes et leur attachement au support, une première coculture a été effectuée en les inoculant simultanément dans le milieu TY en absence du support. Après 24 h d'incubation, une dominance de *B. velezensis* est constatée. La densité optique de la coculture, dont l'aspect ressemble à celui de la monoculture de la bactérie, a atteint $4,5 \pm 0,38$. Aucune croissance fongique n'a été notée. Ce résultat a

été confirmé par des observations microscopiques qui ont montré les spores non germées de *T. harzianum*, parmi les cellules de *B. velezensis* (**Figure 28**).

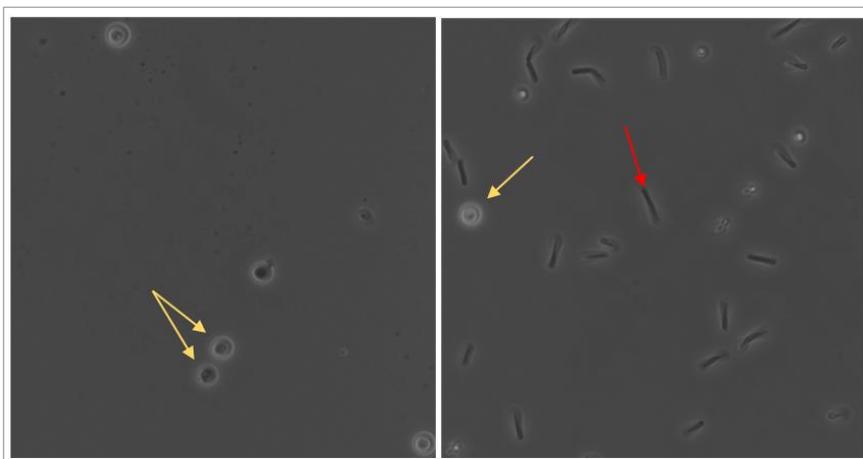


Figure 28 : Observations à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement x 1000 des spores non germées de *T. harzianum* IHEM5437 (flèche jaune) dans l'inoculum et dans la coculture avec *B. velezensis* GA1 (flèche rouge) dans le milieu TY après 24 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm

L'inoculation simultanée d'une bactérie et d'un champignon favorise la croissance de la première souche, qui dans notre cas présente un rythme de croissance supérieur à celui de *T. harzianum*. Pour pallier cette différence de vitesse de développement, une inoculation séquentielle a été effectuée, dans laquelle *T. harzianum* est incubé 24 ou 48 h avant l'inoculation de la bactérie. Cette expérience étant menée en présence du support, la biomasse est quantifiée en termes de densité optique pour *B. velezensis* dans la phase planctonique et de matière sèche pour le biofilm attaché au support **Figure 29**. Les résultats obtenus sont comparés à des monocultures des souches respectives dans les mêmes conditions de culture.

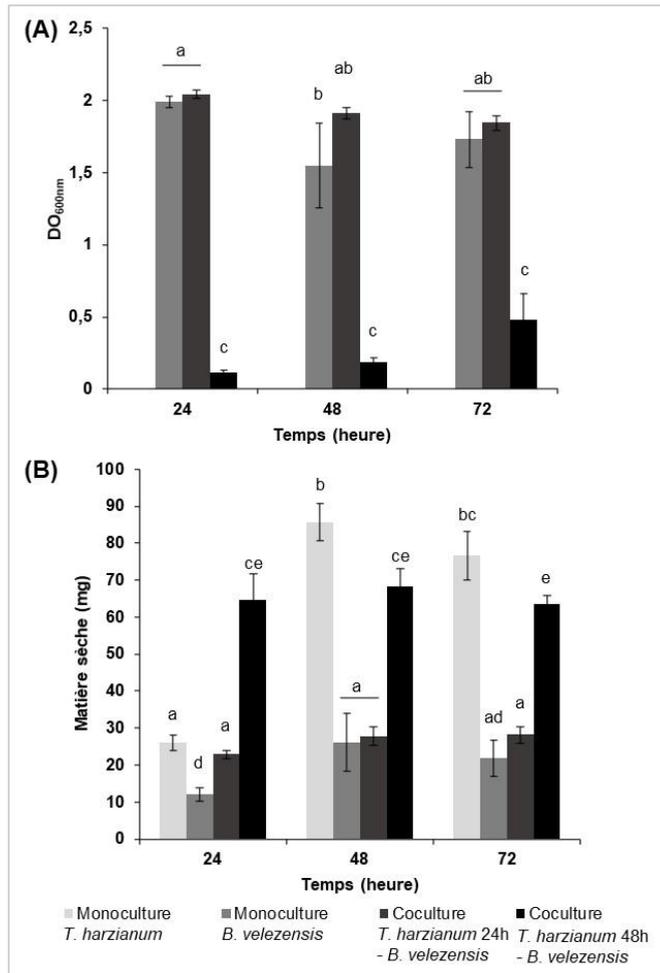


Figure 29 : (A) Quantification de la croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) dans la phase planctonique des monocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 ainsi que dans les cocultures avec inoculation séquentielle (avec un délai de 24 ou 48 h) en présence du support métallique dans le milieu TY après 24, 48 et 72 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm, et (B) quantification de la croissance des biofilms en termes de masse sèche sur le support métallique dans ces mêmes conditions de culture. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$).

Dans la monoculture de *T. harzianum*, une densité optique nulle est mesurée puisque le champignon se développe entièrement sur le support. Dans la monoculture de *B. velezensis*, la DO_{600nm} s'élève à 2,0 après 24 h d'incubation. Une légère baisse est observée à 48 et 72 h. Quand *T. harzianum* est inoculée 24 h avant *B. velezensis*, des valeurs similaires de DO_{600nm} sont obtenues avec une différence non significative avec la monoculture de cette bactérie. Cependant, quand *B. velezensis* est inoculé 48 h après

le champignon, une baisse significative de la croissance bactérienne a été mise en évidence avec une faible $DO_{600nm} = 0,1$ après 24 h d'incubation et qui augmente légèrement pour atteindre environ 0,5 après 72 h d'incubation de la coculture (**Figure 29A**).

La monoculture de *T. harzianum* en présence du support a permis l'attachement de 26 mg de matière sèche après 24 h d'incubation et 60 mg supplémentaires 24 h plus tard. Après 24 h, 12 mg de matière sèche de *B. velezensis* s'est attaché au support en monoculture et cette quantité a doublé à 48 h. Après 24 h de coculture où *B. velezensis* est ajouté 24 h après le champignon (48 h d'incubation pour *T. harzianum*), la masse sèche du biofilm est similaire à celle d'une monoculture de 24 h de *T. harzianum*. Une légère augmentation de la quantité de masse sèche attachée est notée à 48 et 72 h. Quand *B. velezensis* est inoculée 48 h après *T. harzianum* et l'ensemble cocultivé pendant 72 h, la quantité de biofilm attaché au support est de 65 mg et ne varie pas significativement au cours de la culture.

Les observations microscopiques de la biomasse attachée au support ont montré que la pré-colonisation de celui-ci par le champignon favorise l'attachement de la bactérie (**Figure 30**).

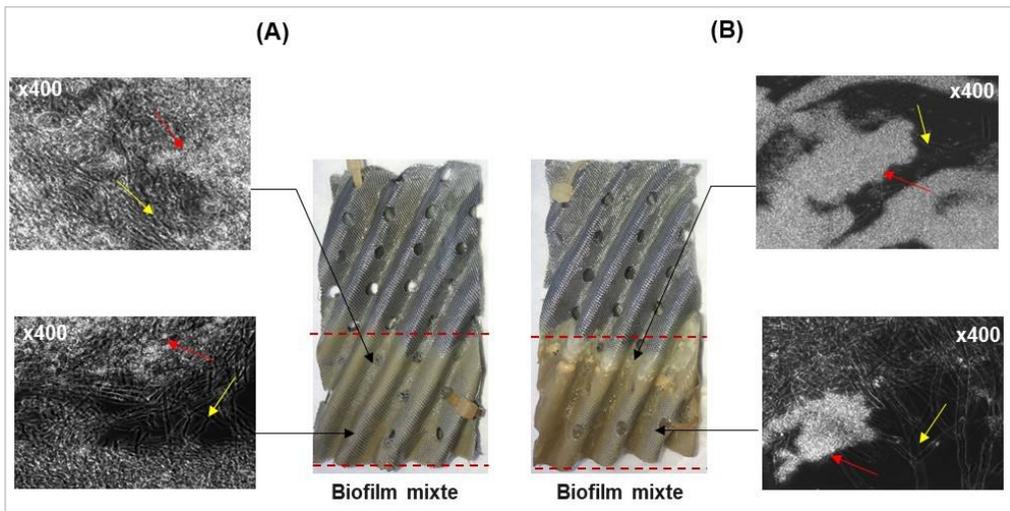


Figure 30 : Observations à l'œil nu et à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement x 400 de l'attachement sur le support métallique des biofilms mixtes de champignon (flèche jaune) et de bactérie (flèche rouge) dans les cocultures avec inoculation séquentielle (A) *T. harzianum* 24 h – *B. velezensis* et (B) *T. harzianum* 48 h – *B. velezensis* dans le milieu TY après 48 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm

Pour la coculture *T. harzianum* 24 h – *B. velezensis*, des biofilms bactériens sont distingués sur les hyphes submergés en continu ou alternativement dans le milieu de culture (**Figure 30A**). Ces biofilms sont plus denses quand *T. harzianum* est pré-cultivé pendant 48 h (**Figure 30B**).

2. Quantification de la proportion relative des biomasses dans un biofilm mixte

La détermination de la matière sèche des biofilms attachés au support ne permet pas de discerner la part de chaque microorganisme mais uniquement de quantifier la totalité. Ainsi, pour pouvoir quantifier la proportion relative de la biomasse de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans les biofilms mixtes, une stratégie se basant sur des analyses en qPCR de séquences géniques des individus a été élaborée. Ce workflow est constitué de 3 étapes majeures : l'établissement d'une relation mathématiques entre la biomasse et la masse sèche pour chaque microorganisme, l'établissement d'une relation mathématiques entre la biomasse et la concentration d'ADN extrait et une étape finale d'analyse par qPCR. Chaque étape requiert des calibrations pour garantir la reproductibilité des résultats. La réussite des différentes étapes permettra alors de déterminer la proportion de chaque microorganisme dans le biofilm mixte en se basant sur le nombre de Ct obtenu après amplification par qPCR. Toutefois, la faible reproductibilité des extractions d'ADN de *B. velezensis* GA1 et la présence d'hybridations non spécifiques des amorces utilisées n'a pas permis d'exploiter cette méthode dans la quantification des microorganismes attachés sur le support.

3. Compatibilité des souches et effet de leur interaction sur leur activité antimicrobienne

3.1. Effet de *B. velezensis* sur la croissance de *T. harzianum*

Les premiers résultats obtenus lors de la coculture avec inoculation simultanée suggère une inhibition de la croissance du champignon par *B. velezensis*. Le rythme de croissance élevé de *B. velezensis* n'est pas le seul facteur à considérer, puisque ce dernier produit des molécules antifongiques (les lipopeptides) qui peuvent inhiber la croissance de *T. harzianum*. Pour élucider le rôle de ces NRPs, deux tests ont été réalisés : une confrontation sur boîte entre *T. harzianum* et différents mutants de la souche GA1 qui produisent un ou deux lipopeptides (**Tableau 5**) et une culture liquide de *T. harzianum* supplémentée avec des lipopeptides isolés.

La confrontation sur boîte de TY entre *T. harzianum* et *B. velezensis* GA1 montre la présence d'une zone d'inhibition de 0,3 cm après 48 h d'incubation. Cette zone est inexistante quand le mutant Δsfp qui ne produit aucun lipopeptide est utilisé. Les mutants simples, produisant deux lipopeptides à la fois, ont entraîné une inhibition de la croissance de *T. harzianum*. La zone d'inhibition est plus importante avec le mutant Δsrf (0,25 cm) suivie par celle du mutant Δfen et Δitu induisant une zone d'inhibition de 0,2 et 0,1 respectivement. L'utilisation des doubles mutants $\Delta srf \Delta itu$, $\Delta fen \Delta itu$ et $\Delta srf \Delta fen$ contre *T. harzianum* a aussi engendré une zone d'inhibition. La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec $\Delta srf \Delta fen$ (0,15 cm) et la plus faible avec $\Delta fen \Delta itu$ (0,05 cm). Une zone d'inhibition de 0,12 cm est notée pour la confrontation de *T. harzianum* avec $\Delta srf \Delta itu$ (**Figure 31A_I** et **A_{II}**).

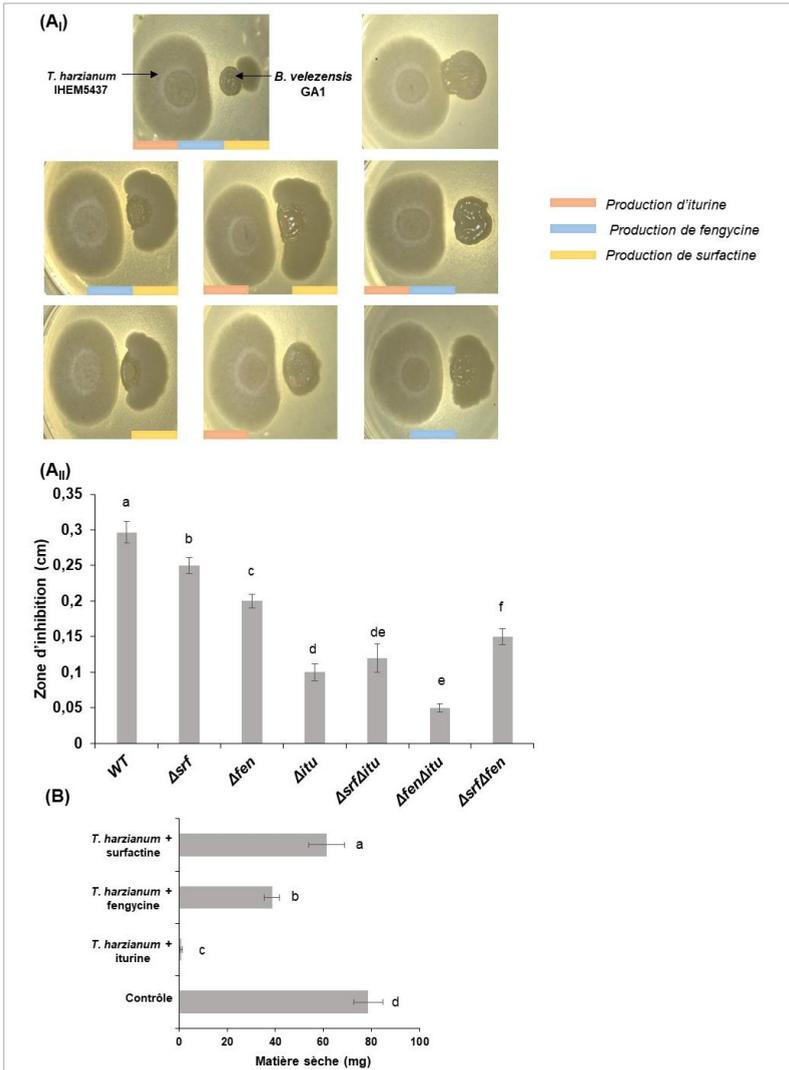


Figure 31 : (A) Tests de confrontation sur boîte de milieu TY entre *T. harzianum*, *B. velezensis* GA1 et ses différents mutants simples et doubles pour les gènes codant pour les synthétases des 3 familles de lipopeptides, (A_i) aspect de croissance des microorganismes sur boîte de Pétri contenant le milieu TY solide, la présence des barres roses, bleus et jaunes correspond respectivement à la capacité du mutant à produire l'iturine, la fengycine et la surfactine, (A_{ii}) La zone d'inhibition (cm) observée entre la colonie de *T. harzianum* IHEM5437 et les mutants de *B. velezensis* GA1. (B) Matière sèche (en mg) de *T. harzianum* obtenue dans une monoculture dans le milieu TY en présence de 12 g.L⁻¹ d'iturine, de fengycine ou de surfactine après 48 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey (significativement différent, $\alpha < 0,05$)).

Sur base de ce test, le mutant produisant de l'iturine et de la fengycine présente la plus grande activité antifongique, soulignant l'implication de ces deux LPs dans l'inhibition de la croissance de *T. harzianum* par rapport à la surfactine. Ce résultat a été confirmé par les observations obtenues avec les doubles mutants.

L'effet direct des lipopeptides sur *T. harzianum* a été déterminé en effectuant des monocultures de ce champignon auxquelles sont ajoutés, séparément, 36 mg de surfactine, de fengycine et de mycosubtiline afin d'atteindre une concentration finale de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de chaque lipopeptide. En comparaison avec la condition contrôle dans laquelle aucun lipopeptide n'est ajouté à la monoculture, 25 % et 50 % de réduction de la croissance de *T. harzianum* sont observées en présence de surfactine et de fengycine respectivement. La mycosubtiline a entièrement inhibé la croissance de ce champignon. La faible masse sèche détectée dans cette condition correspond à la masse de l'inoculum (**Figure 31B**).

3.2. Effet du surnageant de *T. harzianum* sur la croissance et l'activité de *B. velezensis*

La souche *B. velezensis* a été cultivée en monoculture en présence de 5 ou 10 % de surnageant de *T. harzianum* afin de déterminer si ce dernier affecte la croissance et la production de métabolites à activité biocide par la bactérie. Les $\text{DO}_{600\text{nm}}$ après 24 h d'incubation des 2 cultures ne sont pas significativement différentes de celle de la condition contrôle (sans ajout de surnageant) et restent autour de 4,5 (**Figure 32**).

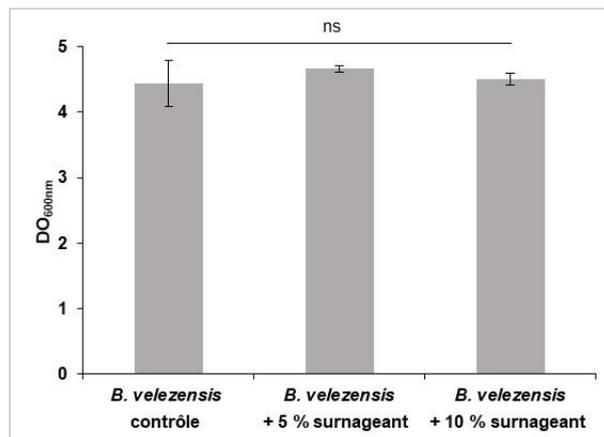


Figure 32 : Croissance de *B. velezensis* GA1 ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) après 24 h d'incubation à 30 °C dans le milieu TY en absence ou en présence de différentes concentrations de surnageant (5 et 10 %) issu d'une monoculture de *T. harzianum* âgée de 48 h dans le milieu TY. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative.

Pour déterminer l'effet du surnageant fongique sur l'activité de *B. velezensis* dans le biocontrôle (en particulier les activités antimicrobiennes), les surnageants des 3 monocultures précédentes de *B. velezensis* ont été déposés dans des puits pour tester leur efficacité dans l'inhibition de certains phytopathogènes bactériens : *A. tumefaciens*, *X. campestris*, *C. michiganensis*, *R. fascians* et des phytopathogènes fongiques : *B. cinerea* et *R. mucilaginosa*. L'inhibition de ces 6 pathogènes est similaire pour les 3 traitements utilisés (**Figure 33**).

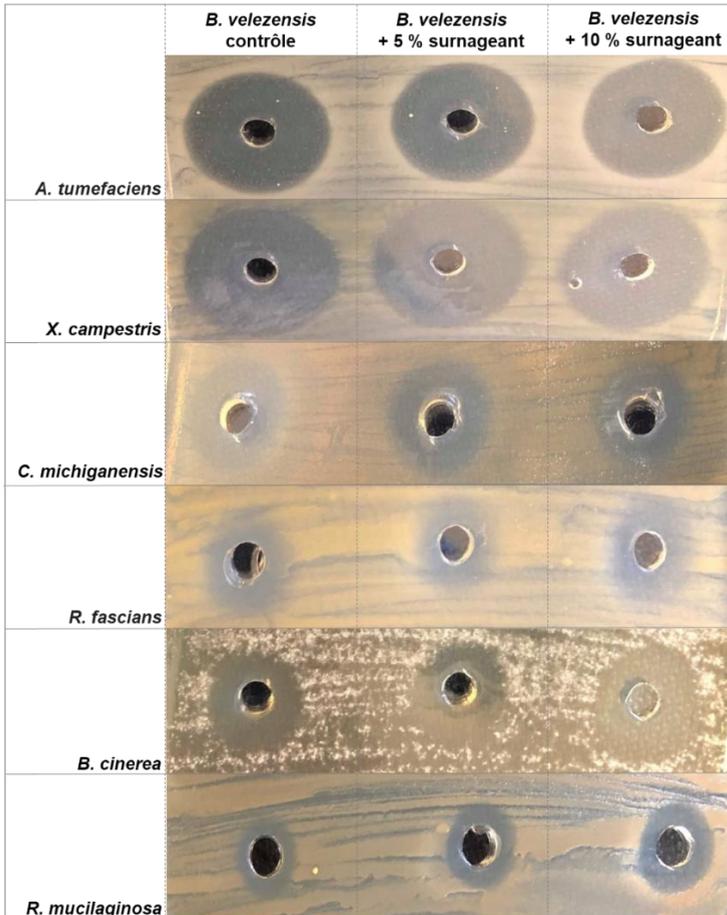


Figure 33 : Détermination de l'inhibition de la croissance de plusieurs phytopathogènes (*A. tumefaciens*, *X. campestris*, *C. michiganensis*, *R. fascians*, *B. cinerea*, *R. mucilaginosa*) par la méthode des puits, en présence de 100 µL de surnageants de *B. velezensis* GA1 issus de monocultures dans le milieu TY, supplémentées ou pas avec différentes concentrations (5 et 10 %) d'un surnageant issu d'une monoculture de *T. harzianum* dans le milieu TY âgée de 48 h. L'expérience est effectuée avec 3 répétitions biologiques.

3.3. Effet de *T. harzianum* sur la production de lipopeptides

Après avoir déterminé l'effet du surnageant de *T. harzianum* sur la production de métabolites antimicrobiens par *B. velezensis*, une attention a été apportée à l'effet sur la production de lipopeptides en monoculture et en coculture avec *T. harzianum*. Les 3 conditions de cocultures : avec inoculation simultanée et avec inoculation séquentielle à 24 et 48 h ont été analysées. La concentration en lipopeptides a été déterminée et comparée à celle de la monoculture de *B. velezensis*.

Des courbes d'étalonnage ont été établies d'un côté pour convertir la DO_{600nm} des cultures en concentration cellulaire afin d'exprimer la production en unité cellulaire, et de l'autre côté pour convertir l'aire des pics correspondants aux lipopeptides dans les chromatogrammes d'UPLC en concentration massique.

Les quatre équations générées sont les suivantes :

$$\text{Concentration cellulaire de } B. \text{ velezensis GA1 (cellule.L}^{-1}\text{)} = 7 \text{ E}^{10} * DO_{600nm} - 3 \text{ E}^9$$

$$\text{Concentration d'iturine (g.L}^{-1}\text{)} = \text{Aire des pics} / 2 \text{ E}^6$$

$$\text{Concentration de fengycine (g.L}^{-1}\text{)} = \text{Aire des pics} / 1 \text{ E}^6$$

$$\text{Concentration de surfactine (g.L}^{-1}\text{)} = \text{Aire des pics} / 642174$$

Lorsque le champignon et la bactérie sont inoculés simultanément, aucune variation significative de la production de lipopeptides n'est remarquée par rapport à la monoculture de *B. velezensis*. En effet, 0,13 et 0,16 pg.cellule⁻¹ d'iturine, 0,28 et 0,32 pg.cellule⁻¹ de fengycine, 0,17 et 0,21 pg.cellule⁻¹ de surfactine y sont produits respectivement (**Figure 34A**).

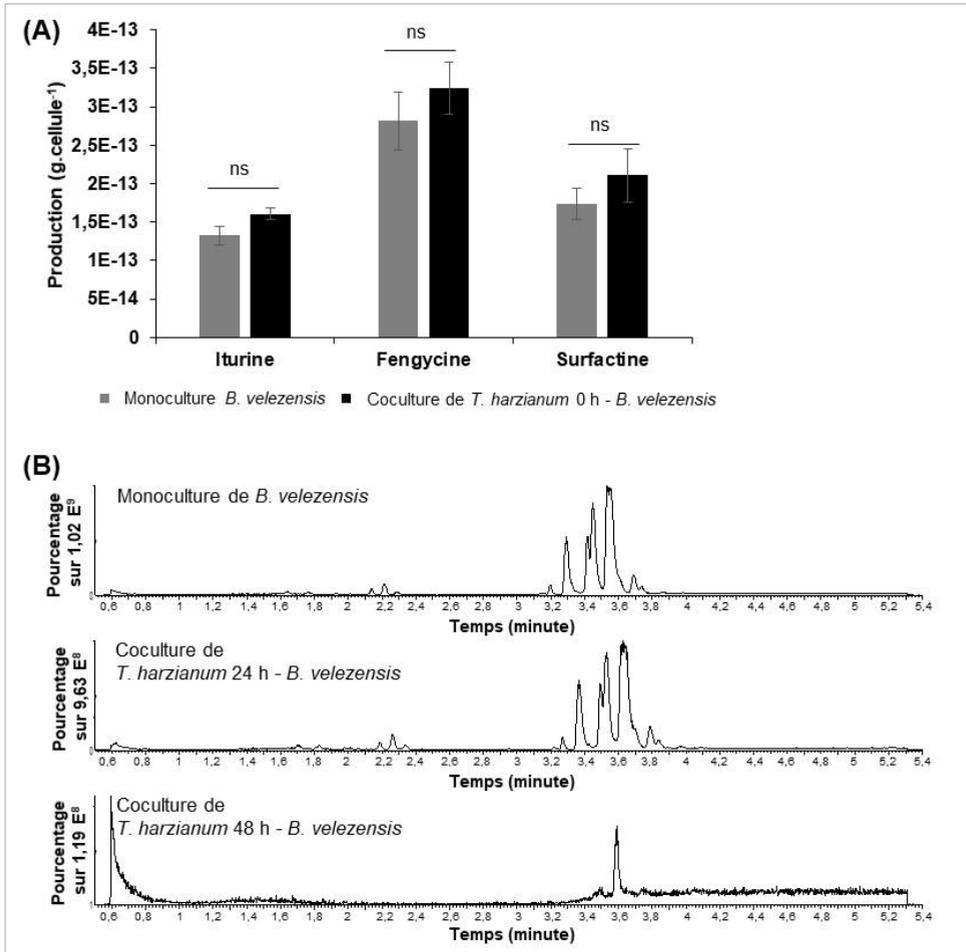


Figure 34 : (A) Concentrations de lipopeptides déterminées par UPLC (en g par cellule) produits en monoculture de *B. velezensis* GA1 dans le milieu TY et en coculture avec inoculation simultanée de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu TY.

Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$. (B) Spectre UV généré par UPLC des lipopeptides produits en monoculture de *B. velezensis* et en coculture avec inoculation séquentielle de *T. harzianum* IHEM5437 24 h - *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 48 h - *B. velezensis* GA1 dans le milieu TY

En ce qui concerne la coculture avec inoculation séquentielle, l'ajout de *B. velezensis* après 24 h de *T. harzianum* engendre un profil d'éluion des lipopeptides par UPLC similaire à celui de la monoculture de *B. velezensis*. En revanche, l'inoculation de la bactérie après 48 h entraîne la diminution voire l'absence de production de lipopeptides, et en particulier des fengycines et iturines (**Figure 34B**).

4. Croissance de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu nitrate MN

4.1. Choix de la source d'azote

Dans l'objectif de sélectionner un milieu de culture qui permettra la croissance des deux microorganismes en cocultures, les données relatives au métabolisme de l'azote chez les microorganismes du genre *B. velezensis* et *T. harzianum* ont été extraites de KEGG puis analysées. Les souches *B. velezensis* FZB42 et *T. reesei* QM6a ont été utilisées comme souches de référence à défaut de la disponibilité d'information sur le métabolisme des souches d'intérêt étudiées au cours de ce projet.

La capacité de ces deux souches à assimiler les différentes sources d'azote minéral a pu être démontrée. *B. velezensis* FZB42 et *T. reesei* QM6a sont capables d'utiliser l'ammonium comme source unique d'azote puisqu'ils disposent des enzymes requises à cet effet. *T. reesei* possède les enzymes impliquées dans la réduction du nitrate (NR) et du nitrite (Nit-6) en ammonium utilisable comme source d'azote pour sa croissance. De son côté, *B. velezensis* produit une nitrate réductase (NasAB) mais pas de nitrite réductase, ce qui entrave la production d'ammonium et subséquemment la biosynthèse d'acides nucléiques et d'acides aminés pour le développement de la biomasse (**Figure 35**).



Figure 35 : Réduction du nitrate par voie assimilatoire chez *T. reesei* QM6a et *B. velezensis* FZB42 en nitrite par la nitrate réductase NR et NasAB respectivement, puis en ammonium par la nitrite réductase Nit6 chez *Trichoderma*. Le gène codant pour une nitrite réductase (NirA) dans *Bacillus* n'est pas présent chez *B. velezensis* (d'après KEGG)

La séquence génétique codante pour les enzymes réductases a été extraite de KEGG et un alignement de séquence (via l'outil BLASTn) a été effectué avec le génome de *T. harzianum* T22 (le génome séquencé disponible pour les espèces *T. harzianum*) et *B. velezensis* GA1. La présence de séquences codantes pour la nitrate et la nitrite réductase a été mise en évidence chez le champignon, ainsi que celle de la nitrate réductase chez la souche GA1. Les séquences des nitrite réductases Nit-6 et NirA ont été comparées avec le génome de *B. velezensis* GA1 et aucune similitude n'a été détectée. Ceci confirme que cette souche est incapable d'assimiler le nitrate s'il est l'unique source d'azote présente.

En conséquence, l'utilisation d'un milieu de culture contenant de l'azote uniquement sous forme nitrate offre une voie potentielle pour créer une dépendance nutritionnelle entre *B. velezensis* et *T. harzianum*. Cette dépendance pourrait permettre de générer une interaction positive entre ces microorganismes.

4.2. Monoculture de *B. velezensis* GAI et *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN

Le milieu nitrate, un milieu défini contenant du nitrate comme unique source d'azote, a été utilisé pour étudier l'interaction de ces deux souches. Des monocultures et des cocultures avec inoculation simultanée ont été réalisées et incubées 6 jours en présence ou en absence du support métallique. Puisque nous nous intéressons particulièrement à la croissance de la bactérie dans ce milieu, une cinétique a été établie grâce à la technique de cytométrie en flux qui a permis de déterminer la concentration cellulaire chaque 24 h, pendant les 6 jours de culture. La cinétique de croissance de *T. harzianum* a été suivie uniquement en monoculture planctonique, et la masse sèche finale a été déterminée pour les cocultures en conditions planctonique et immobilisée.

En monoculture en condition planctonique, *T. harzianum* se développe en formant des pellets, tandis qu'en présence du support, l'ensemble de la biomasse s'attache sur ce dernier. Dans la première condition, une masse sèche de 48 mg s'est formée et dans la seconde 60 mg de biofilm s'est attaché au support (**Figure 36A**).

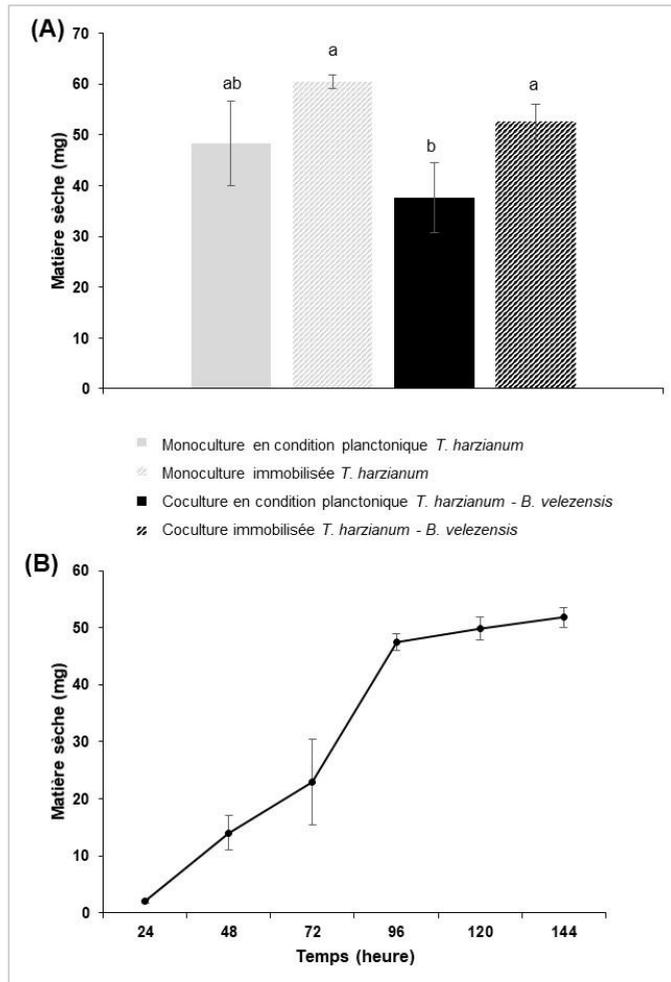


Figure 36 : (A) Matière sèche de *T. harzianum* IHEM5437(en mg) en monocultures et cocultures avec *B. velezensis* en conditions planctoniques et sur support dans le MN après 6 jours d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$), (B) Cinétique de croissance de *T. harzianum* établie en fonction de la matière sèche (en mg) formée en monoculture planctonique dans le MN pendant 6 jours d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm

La cinétique de croissance en condition planctonique dans MN montre une phase exponentielle de 3 jours, puis une entrée en phase stationnaire à partir du 4^{ème} jour de culture (**Figure 36B**).

La croissance de *B. velezensis* GA1 en monoculture dans le MN, que ce soit en condition planctonique ou sur support, est relativement faible. Dans la première condition, la quantité de cellules initiales ($2 \cdot 10^7$ cellules approximativement) a

augmentée de 3,5 fois. Cette quantité est ensuite restée stable avec une légère augmentation pendant 4 jours de culture après lesquels elle a triplé pour atteindre une concentration de $2,7 \cdot 10^8$ cellule.L⁻¹ (**Figure 37A**).

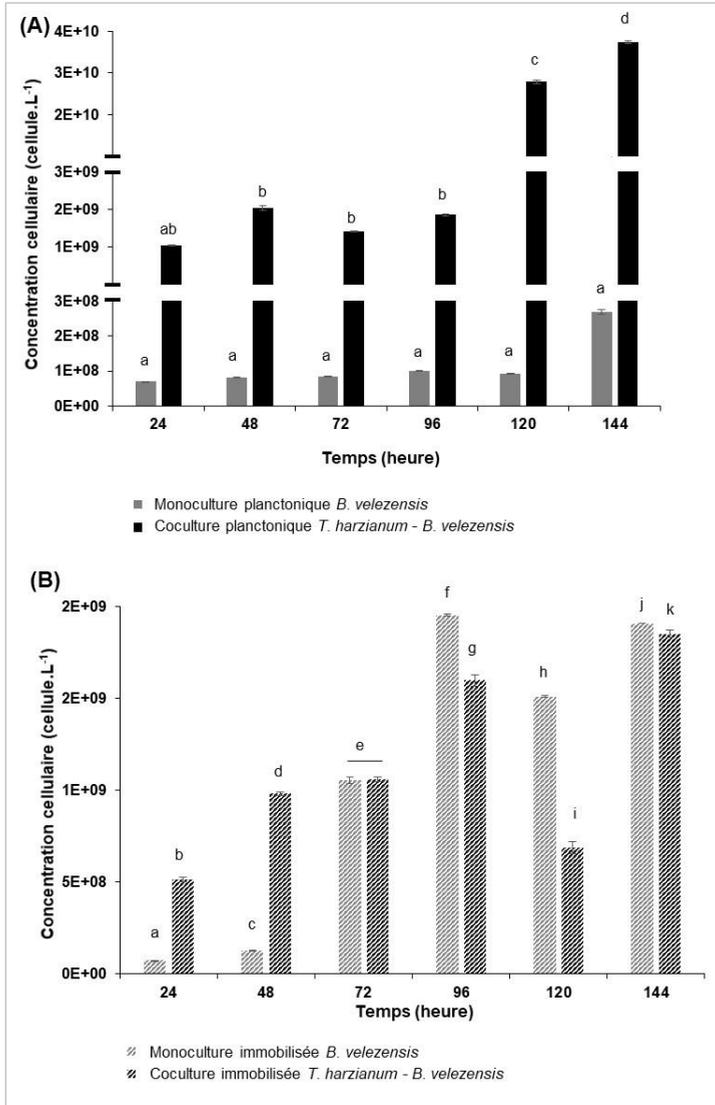


Figure 37 : Suivi de la concentration de *B. velezensis* GA1 par cytométrie en flux dans la phase planctonique en monoculture et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 pendant 6 jours de culture dans le MN en conditions (A) planctonique et (B) immobilisée. Les graphiques montrent la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$).

Quand un support est utilisé, une tendance différente est observée, même si après 24 h d'incubation le résultat est similaire à celui observé en condition planctonique (concentration cellulaire augmentée de 3,8 fois). A 48 h, la concentration de cellules bactériennes a atteint $1,3 \cdot 10^8$ et une augmentation exponentielle amène cette concentration à $1,9 \cdot 10^9$ cellule.L⁻¹ au dernier jour d'incubation. Une faible chute de 23 % de cette concentration est observée au 5^{ème} jour (**Figure 37B**).

4.3. Coculture de *B. velezensis* GAI et *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN

Après 6 jours de coculture de *B. velezensis* et *T. harzianum*, il est constaté que ces deux microorganismes sont capables de se développer conjointement. La masse sèche de *T. harzianum* après 6 jours de coculture est de 38 et 53 mg en conditions planctonique et immobilisée sur support respectivement (**Figure 36A**).

En ce qui concerne le développement de *B. velezensis* en coculture en condition planctonique, la concentration des cellules a augmenté de 50 fois après 24 h de culture, puis elle a doublé à 96 h. Au 5^{ème} jour de coculture, la bactérie s'est développée pour atteindre une concentration de $3,7 \cdot 10^{10}$ cellule.L⁻¹ (**Figure 37A**). L'utilisation du support en coculture a induit, après 1 jour d'incubation, une multiplication de la quantité initiale de bactéries par 25, quantité de nouveau multipliée par 3 après 4 jours. Une baisse de 50 % apparaît au 5^{ème} jour et la concentration cellulaire atteignant alors $6,8 \cdot 10^8$ cellule.L⁻¹, augmente ensuite jusqu'à $1,9 \cdot 10^9$ cellule.L⁻¹ le dernier jour d'incubation (**Figure 37B**).

Pendant la coculture, un attachement des cellules de *B. velezensis* au mycélium de *T. harzianum* est observé par microscopie à balayage électronique. Dans la coculture en condition planctonique, cet attachement est plus faible. Les cellules sont éparpillées sur les hyphes condensées en pellet (**Figure 38A**).

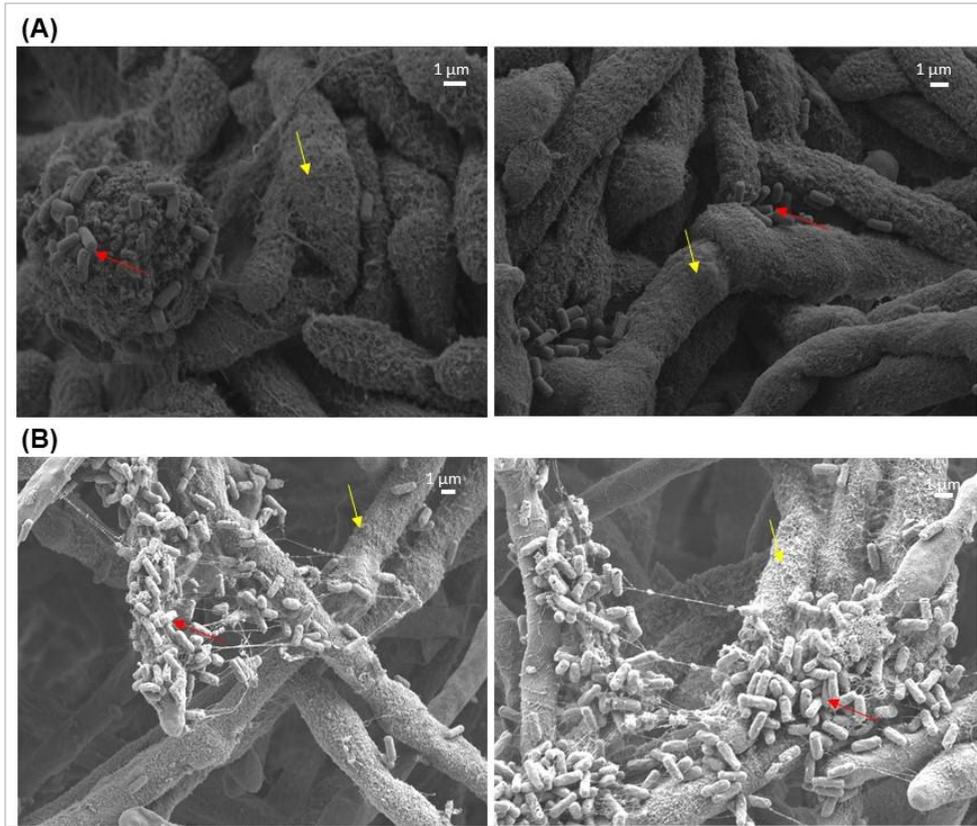


Figure 38 : Observation par microscopie électronique à balayage des cocultures de *B. velezensis* GA1 (flèche rouge) et *T. harzianum* IHEM5437 (flèche jaune) âgées de 6 jours dans le MN en (A) conditions planctonique (avec un grossissement x 5500 pour l'image de gauche et x 4500 pour l'image de droite) et (B) sur support (avec un grossissement x 3300 pour l'image de gauche et x 4000 pour l'image de droite)

Dans la coculture en présence de support, *B. velezensis* forme des biofilms denses sur le mycélium du champignon (**Figure 38B**).

4.4. Suivi de la consommation du glucose dans les monocultures et cocultures

La consommation du glucose, l'unique source de carbone dans le MN, a été suivie par HPLC pendant les 6 jours de monoculture et de coculture de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437. Une courbe d'étalonnage a été préalablement établie afin de permettre la conversion de l'aire des pics correspondants au glucose dans les chromatogrammes de l'HPLC en concentration en g.L^{-1} .

Une équation a été générée pour effectuer cette conversion :

$$\text{Concentration glucose (g.L}^{-1}\text{)} = \text{Aire des pics} / 354581$$

En monoculture en condition planctonique ou immobilisée sur support de *T. harzianum*, le glucose est consommé rapidement pendant les 3 premiers jours de culture, jusqu'à épuisement après le 4^{ème} jour.

Aucune consommation de glucose n'est observée dans les deux conditions de monoculture de *B. velezensis*.

En coculture en condition planctonique, la consommation du glucose est plus lente et s'étale sur les 6 jours de culture. La totalité du glucose est consommée le dernier jour de culture. En présence du support, la concentration du glucose diminue graduellement jusqu'à 0,4 g.L⁻¹ en 96 h. Après 24 h (5 jours de coculture), aucune trace de glucose n'est observée (**Figure 39**).

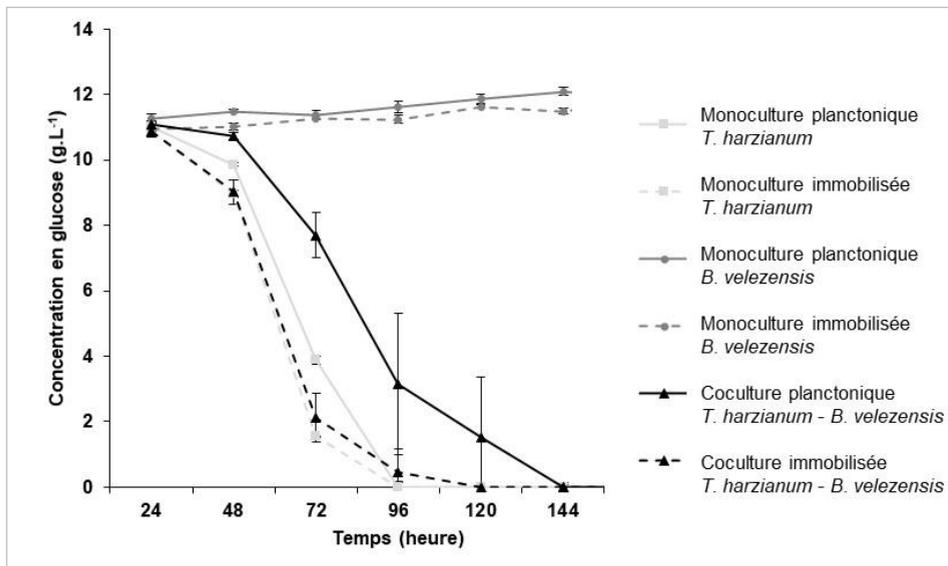


Figure 39 : Suivi de la consommation de glucose (en g par L) en monocultures et en cocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 en conditions planctonique et immobilisée sur support dans le MN

5. Compatibilité des souches dans le milieu nitrate

Le comportement des microorganismes en coculture dans le milieu nitrate a été investigué afin de déterminer si la croissance de l'un est inhibée par la présence de l'autre.

Pour *T. harzianum*, l'évaluation de sa viabilité dans la coculture a été effectuée sur une boîte de Pétri contenant du MN solide ensemencé avec le champignon. Le surnageant de la coculture a été ajouté dans un puits. Aucune inhibition de la croissance de ce champignon n'a été constatée (**Figure 40**).



Figure 40 : Effet du surnageant de la coculture de *B. velezensis* et *T. harzianum* dans le MN sur la croissance de *T. harzianum* IHEM5437 déterminé par la méthode des puits

L'état de *B. velezensis* GA1 a été évalué en analysant la viabilité et l'activité métabolique des cellules par cytométrie en flux grâce à l'utilisation du PI et du RSG respectivement. Toutes les analyses de viabilité des cellules de *B. velezensis* en monoculture et en coculture planctoniques ou en présence d'un support ont montré que les cellules bactériennes sont vivantes. Le signal de fluorescence détecté correspond à une imperméabilité des membranes cellulaires témoignant de la survie des cellules

Toutefois, leur activité métabolique, reflétée par leur activité respiratoire ou de réduction, présente des variations selon le type de culture (monoculture ou coculture) mais pas selon la condition de culture (planctonique ou immobilisée sur support) (**Figure 41**).

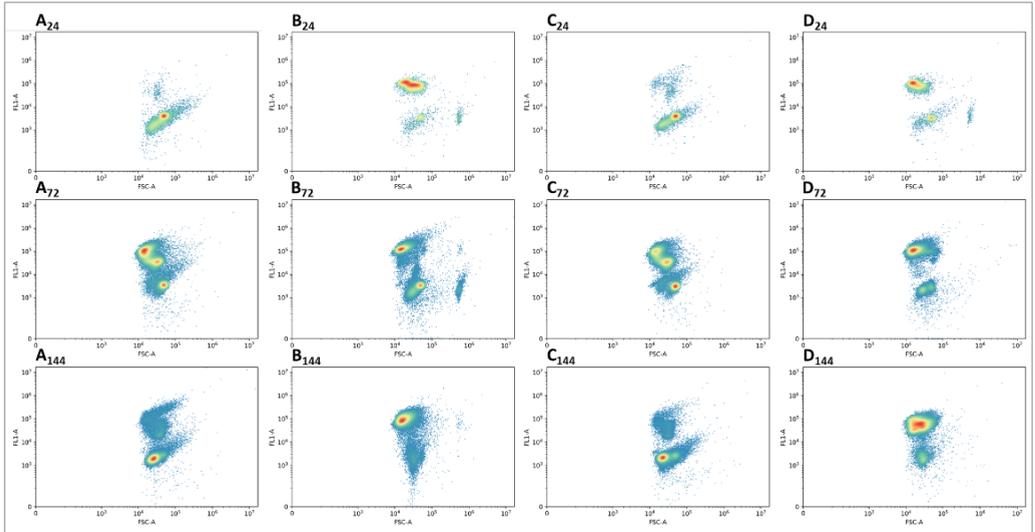


Figure 41 : Détermination de l'activité métabolique des cellules de *B. velezensis* GA1 par cytométrie en flux avec le RSG en monoculture en condition (A) planctonique et (C) immobilisée sur support et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 en condition (B) planctonique et (D) immobilisée sur support, à 24 h, 72 h, et 144 h de culture dans le MN. Les résultats sont exprimés en termes de side scatter (SSC), forward scatter (FSC) et de fluorescence verte (FL1) avec un dénombrement de 40000 cellules. Toutes les expérimentations ont été menées en triplicat. Les couleurs rouge et bleu correspondent respectivement à une forte et une faible population.

Dans les deux conditions de monoculture, 5 à 12 % des cellules sont métaboliquement actives après 24 h de culture. A 72 h, ce taux augmente à 65 % avec la présence de deux populations microbiennes ayant une activité respiratoire différente. Ce pourcentage diminue ensuite à 22 % à la fin de la culture. En revanche, la coculture avec *T. harzianum* permet de rendre les bactéries plus actives métaboliquement. La majorité des cellules sont capables de métaboliser le RSG tout au long de la coculture. Après 24 h d'incubation, 93 % des cellules sont actives. Une faible population bactérienne perd son activité après 72 h (30 %) mais à la fin de la coculture 85 % des bacilles demeurent actifs.

6. Validation du modèle de la coculture

Les résultats obtenus avec l'utilisation de MN démontre la difficulté de *B. velezensis* GA1 à se développer en monoculture avec le nitrate comme source d'azote. La coculture avec *T. harzianum* a permis d'apporter une solution à ce problème. Afin de confirmer l'implication de la source d'azote dans le comportement de *B. velezensis* et de vérifier si ce modèle de coculture est applicable avec d'autres souches, deux types de validations ont été effectuées. Pour ces expériences, les cultures ont été réalisées uniquement en condition planctonique afin de pouvoir facilement quantifier les différentes biomasses.

6.1. Variation de la source d'azote

Les analyses du métabolisme de l'azote ont montré que *B. velezensis* peut utiliser l'ammonium pour se développer. Une monoculture de cette souche ainsi qu'une coculture avec *T. harzianum* ont été réalisées dans du MN supplémenté avec 10 mM de sulfate d'ammonium et dans un MN où le nitrate est totalement substitué par de l'ammonium. La croissance de *B. velezensis* dans toutes ces conditions a été quantifiée. Dans la première, des DO_{600nm} de 1,06 et 1,1 ont été obtenues en monoculture et en coculture respectivement. Concernant la condition où la totalité du nitrate a été substituée par l'ammonium, les valeurs de DO_{600nm} de 6,6 et 5,5 ont été respectivement obtenues. En coculture, aucune croissance de *T. harzianum* n'a pu être détectée (Figure 42).

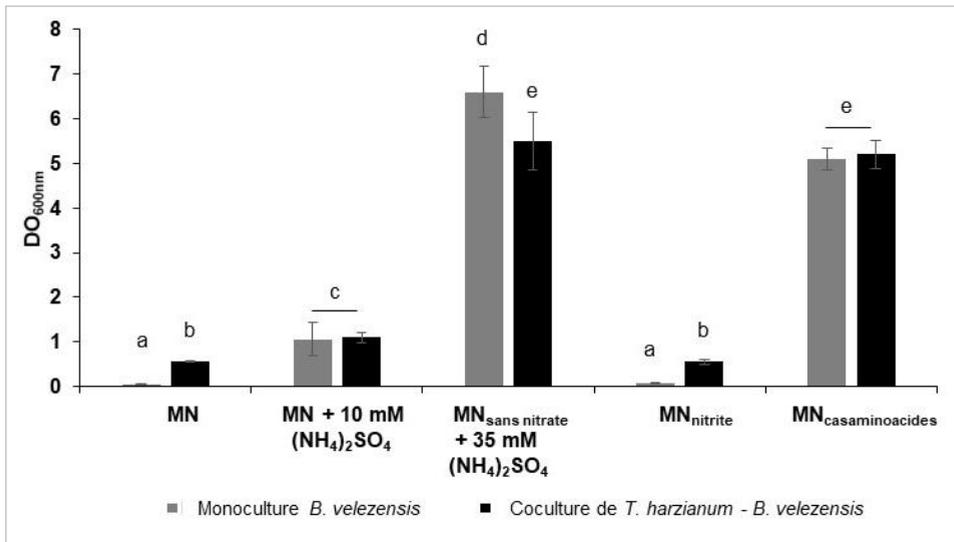


Figure 42 : Croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) en monoculture et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN, le MN supplémenté avec 10 mM de sulfate d'ammonium, le MN sans nitrate MN supplémenté avec 35 mM de sulfate d'ammonium, le MN où le nitrate est substitué par le nitrite et le MN supplémenté avec 0,1 % de casaminoacides après 48 h d'incubation pour les monocultures et 144 h d'incubation pour les cocultures à 30 °C. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$)

Du fait de l'absence de la nitrite réductase, *B. velezensis* n'est pas en mesure d'assimiler le nitrite. Le nitrate du MN a donc été substitué par du nitrite et des monocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437, ainsi qu'une coculture, ont été réalisées. Une très faible croissance a été constatée en monoculture ($DO_{600nm} = 0,08$) tandis qu'en coculture la bactérie a pu se développer et atteindre une densité optique égale à 0,55.

Par la suite, plusieurs sources d'azote organique ont été testées pour vérifier si la suppression de la dépendance nutritionnelle modifie la compatibilité des souches. L'ajout de casaminoacides au MN a induit la croissance de *B. velezensis* en monoculture et en coculture à des DO_{600nm} finales respectives de 5,1 et 5,2. En coculture, le développement de *T. harzianum* est inhibé par la bactérie (**Figure 42**).

Des monocultures de *B. velezensis* ont été réalisées dans du MN en présence des 20 acides aminés séparément afin de vérifier si ces sources d'azote permettent la croissance de la bactérie dans ce milieu de culture. La DO_{600nm} des monocultures a été suivie en continu dans un lecteur de microplaque et pendant 48 h de culture (**Figure 43**).

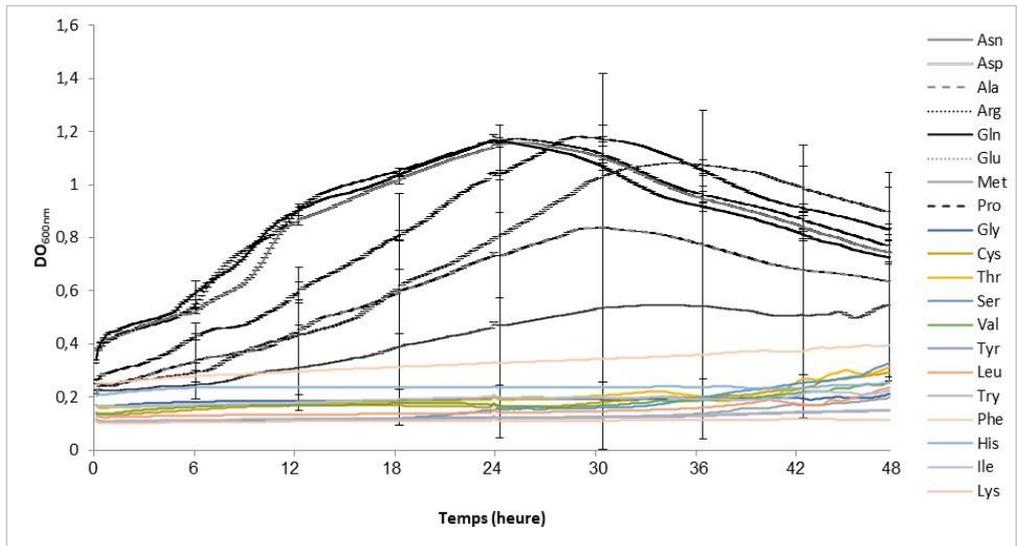


Figure 43 : Suivi de la croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) en microplaque pendant 48 h, en monoculture dans le MN supplémenté séparément avec les 20 acides aminés avec une concentration finale de 1 mM. Le graphique montre la moyenne et les écart-types de trois répétitions biologiques.

Les acides aminés permettant la croissance de *B. velezensis* dans le MN sont l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine, l'alanine, l'arginine, la proline et l'acide aspartique. La plus forte croissance a été observée avec l'asparagine, la glutamine, l'arginine et la proline où une DO_{600nm} proche de 1,2 a été atteinte.

6.2. Validation du modèle sur différentes souches de *Bacillus* et *Trichoderma*

La reproductibilité des résultats obtenus avec d'autres espèces de *Bacillus* et *Trichoderma* a été vérifiée via des monocultures des bactéries et des cocultures avec les différents champignons dans du MN et du MN_{nitrite}. Deux souches de *B. velezensis* produisant des lipopeptides (FZB42 et S499) et une espèce de *B. licheniformis* ont été utilisées. Cette dernière possède les enzymes requises à l'assimilation du nitrate comme unique source d'azote. En plus de *T. harzianum* IHEM5437, *Trichoderma* sp. MUCL58094 et *T. atrobrunneum* MUCL58095 ont été testés en coculture respectivement avec les bactéries citées précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 44**.

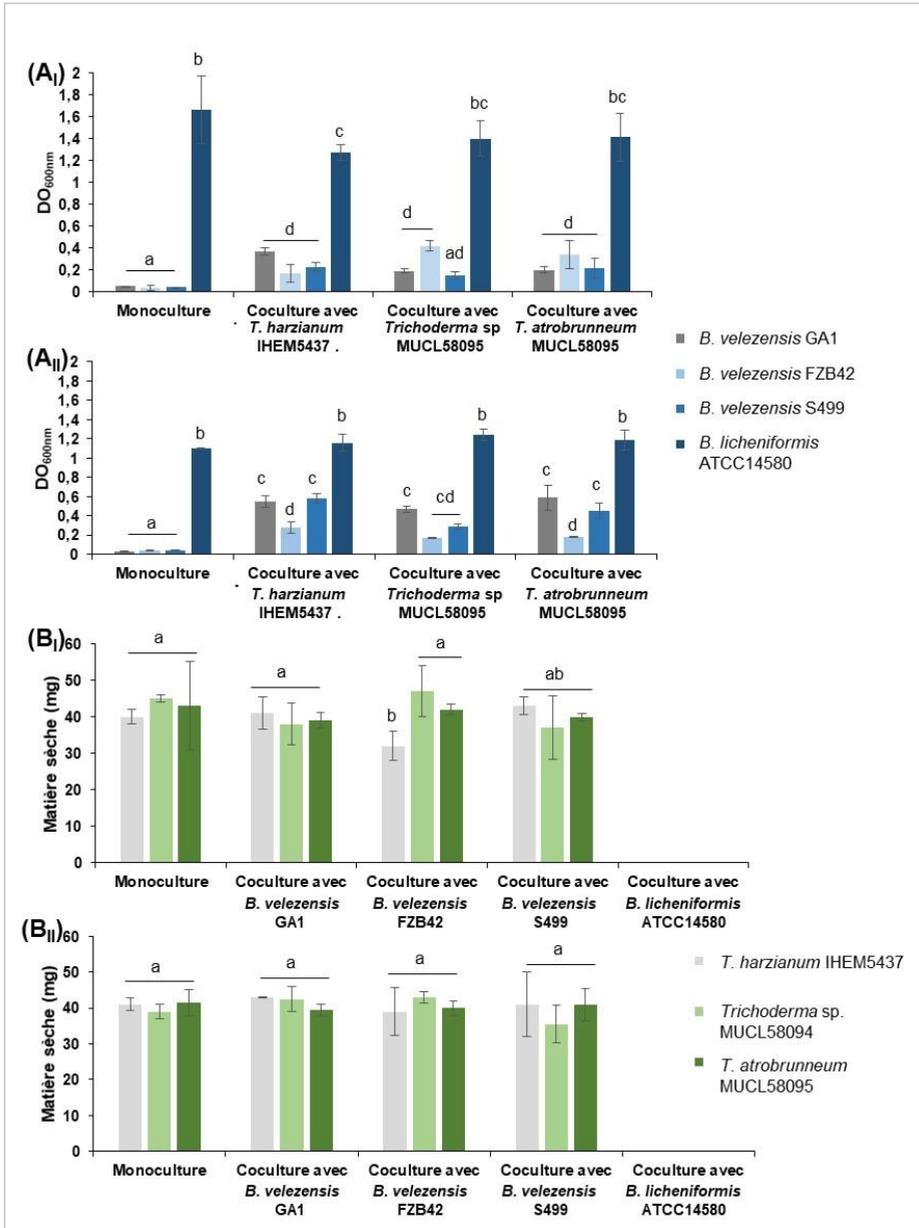


Figure 44 : (A) Croissance des bactéries *B. velezensis* GA1, *B. velezensis* FZB42, *B. velezensis* S499 et *B. licheniformis* ATCC14580 (DO_{600nm} mesurée après 48 h pour les monocultures et 144 h pour les cocultures) et (B) des champignons *T. harzianum* IHEM5437, *Trichoderma* sp. MUCL58094 et *T. atrobrunneum* MUCL58095 (matière sèche en mg mesurée après 144 h d'incubation) en monoculture et en coculture dans le MN (I) et MN_{nitrite} (II) incubées à 30 °C avec une agitation de 100 rpm. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$).

Aucune des souches de *B. velezensis* n'est capable de se développer significativement dans le MN ou le MN_{nitrite} en monoculture, à l'opposé de *B. licheniformis* qui a atteint une DO_{600nm} autour 1,4 en MN et 1,1 en MN_{nitrite} (**Figure 44A, I et II**). La coculture avec les 3 souches de *Trichoderma* a permis une croissance de toutes les souches de *B. velezensis* dans les deux milieux de culture. La croissance des champignons en coculture avec *B. licheniformis* est inhibée, probablement du fait d'une croissance plus rapide et plus importante de la bactérie. Toutefois, en coculture avec les bactéries de l'espèce *B. velezensis*, une croissance des champignons a été constatée. Cette croissance n'est pas différente de celle en monoculture de ces mêmes champignons, avec une masse sèche moyenne obtenue de 40 mg dans 100 mL de milieu de culture (**Figure 44B, I et II**).

7. Effet de *T. harzianum* sur la croissance de *B. velezensis* GA1 dans le milieu nitrate

7.1. Croissance de *B. velezensis* avec les composantes de la monoculture de *T. harzianum*

Les résultats obtenus jusqu'ici montrent que *T. harzianum* favorise et amplifie la croissance de *B. velezensis* dans le MN en absence de source d'azote assimilable par la bactérie. Afin de mieux comprendre comment le champignon intervient dans la croissance de la souche GA1, des monocultures de cette dernière en présence du mycélium désactivé du champignon ou de son surnageant ont été effectuées.

L'ajout du mycélium n'a pas permis d'induire un développement de *B. velezensis* en monoculture.

Des surnageants de monocultures de *T. harzianum* IHEM5437 prélevés à 24, 48, 72, 96, 120 et 144 h ont été ajoutés séparément à la monoculture de *B. velezensis* en microplaque pour une concentration finale de 10 %. La croissance a été suivie pendant 30 h. La croissance de la bactérie est d'autant plus favorisée lorsque l'âge de la monoculture de *T. harzianum* dont provient le surnageant augmente. La plus faible croissance a été obtenue avec le surnageant de 24 h et la croissance la plus importante avec les surnageants de 120 et 144 h. La densité optique de la monoculture de *B. velezensis* dépasse 0,3 quand le milieu de culture est supplémenté avec le surnageant d'une monoculture de *T. harzianum* de 144 h (**Figure 45A**).

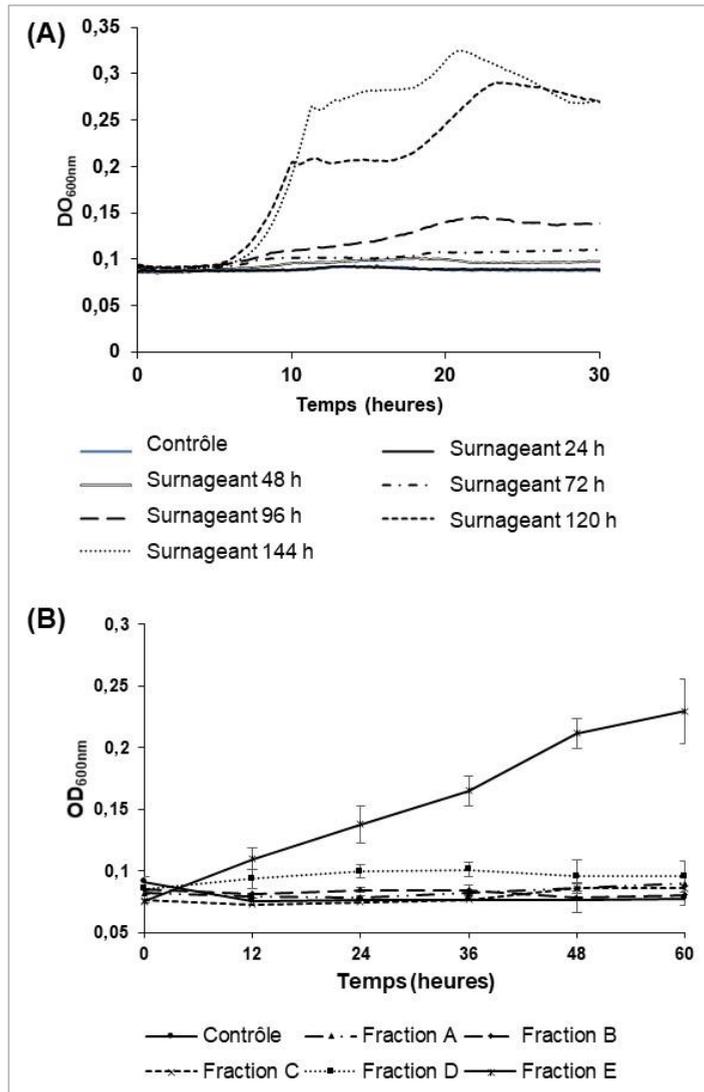


Figure 45 : (A) Croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) en monoculture dans le MN en présence du surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 pris chaque 24 h d'une monoculture de ce champignon, et (B) en présence des différentes fractions du surnageant pris à 144 h de culture (Fraction A, B, C, D et E renfermant respectivement les molécules de masse moléculaires supérieures à 50 kDa, entre 30 et 50 kDa, 10 et 30 kDa, 3 et 10 kDa et inférieures à 3 kDa)

Ce surnageant a ensuite été fractionné en fonction de la masse moléculaire des molécules. Les différentes fractions ont été ajoutées au milieu de culture de *B. velezensis* en microplaque et la croissance a été suivie. L'ajout des fractions A, B, C et D renfermant les molécules de masses moléculaires supérieures à 3 kDa n'a pas induit la croissance de la bactérie. Toutefois, la fraction E qui renferme les molécules

de taille moléculaire inférieure à 3 kDa a permis d'induire une croissance de *B. velezensis* en monoculture dans le MN, avec une DO_{600nm} de 0,23 après 60 h de culture (**Figure 45B**).

Dans un test similaire, 90 % de surnageant de *T. harzianum* de 144 h a été ajouté à la monoculture de *B. velezensis*. Un milieu MN10X a ainsi été utilisé afin de ne pas diluer les autres apports nutritionnels après l'ajout du surnageant. La DO_{600nm} de la culture a été mesurée après 30 h d'incubation et estimée à 7,9, montrant bien que l'effet de stimulation observée dépend de la concentration d'au moins l'une des molécules présente dans le surnageant et en particulier des molécules de masse moléculaire plus petite que 3 kDa.

7.2. Analyse de la composition du surnageant

Puisque le surnageant du champignon permet d'induire la croissance de *B. velezensis*, une analyse poussée a été effectuée dans le but de déterminer quelles molécules sont présentes dans celui-ci. Ces molécules étant sensées être une source d'azote, les analyses se sont focalisées sur les peptides et les acides aminés présents.

7.2.1. Identification des peptides

Dans un premier temps, la composition du surnageant du champignon et de ses fractions a été étudiée par MALDI-TOF, avec une attention spécifique sur la fraction E qui semble renfermer la source d'azote d'intérêt. D'après les chromatogrammes obtenus, les molécules présentes dans le surnageant sont réparties dans les différentes fractions. Quant à la fraction E, elle renferme bien les molécules ayant les plus faibles rapports m/z, allant de 634 à 861 (**Figure 46**).

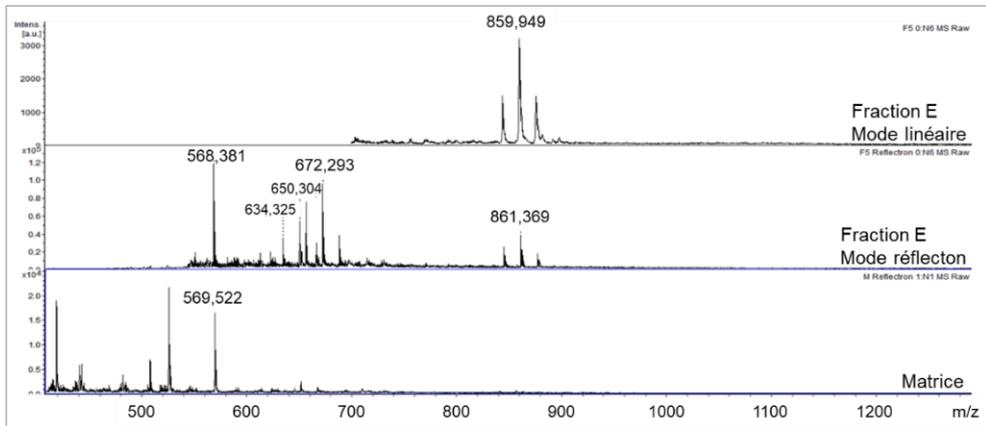


Figure 46 : Chromatogrammes MALDI-TOF de la fraction du surnageant d'une culture de 144 h de *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu MN renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa établi en mode linéaire et mode réflecton

Pour détecter les ions ayant un plus faible rapport masse/charge, une analyse supplémentaire par HPLC-ESI-Q/TOF a été réalisée. La fraction E du surnageant de *T. harzianum* a été concentrée afin d'augmenter la possibilité de détecter les molécules

les plus diluées. Cette analyse a permis de mettre en évidence 6 molécules de rapport m/z égal à 453, 393, 349, 405, 305 et 227 (**Figure 47**). Les pics correspondants à ces molécules sont accentués dans la fraction du surnageant concentrée.

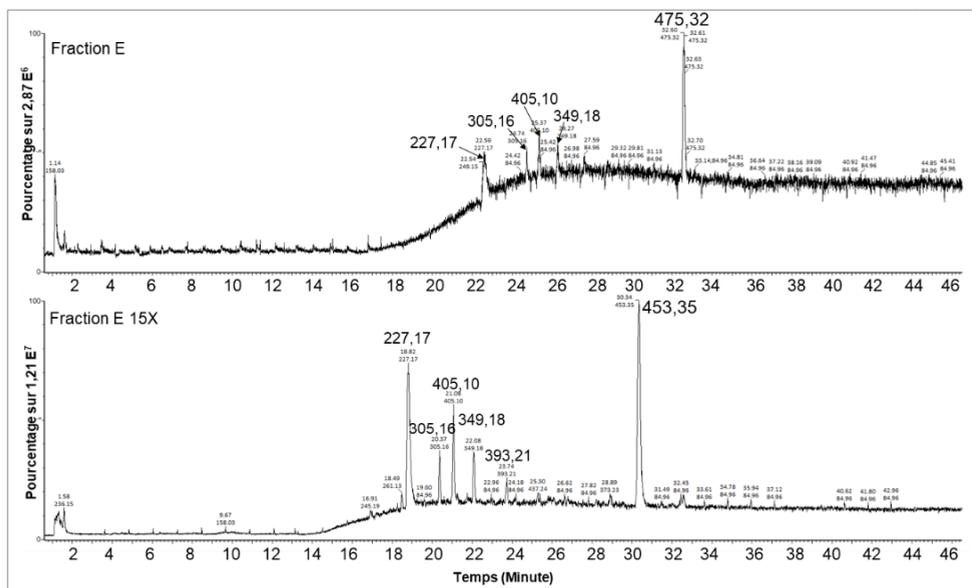


Figure 47 : Chromatogramme HPLC-ESI-Q/TOF de la fraction du surnageant d'une culture de 144 h de *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu MN renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa et de cette même fraction concentrée 15 fois

Le spectre de masse des pics obtenus dans le chromatogramme a ensuite été analysé afin de vérifier que les pics correspondent bien à des molécules. Dans ce cas, le pic équivalant à la masse de chaque molécule se retrouve joint par celui de la masse + 1 (molécule protonée). Ceci est bien le cas de tous les pics observés dans le chromatogramme, ce qui confirme que ces pics correspondent bien à des molécules présentes dans le surnageant de *T. harzianum* (**Figure 48**).

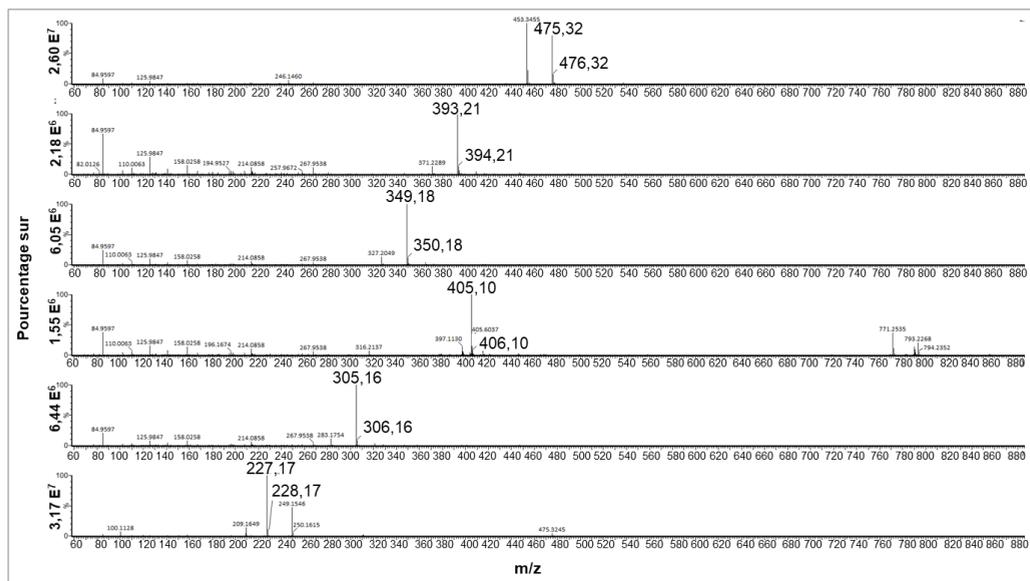


Figure 48 : Spectre de masse des différents pics du chromatogramme de l’HPLC-ESI-Q/TOF correspondant à la fraction du surnageant d’une culture de 144 h de *T. harzianum* IHEM5437 dans le milieu MN renfermant les molécules de masse moléculaire inférieure à 3 kDa

Par confrontation de ces données avec celles répertoriées dans la base de données UniProt, restreinte au protéome de l’organisme *T. harzianum*, ces molécules ont été identifiés comme étant des peptides renfermant des domaines d’amino-oxydases.

7.2.2. Identification des acides aminés

La composition en acides aminés du surnageant de la monoculture de *T. harzianum* dans le MN est déterminée aux jours 3, 4, 5 et 6 de culture. Avant tout, la concentration d’azote totale dans les différents échantillons est dosée avec le kit HACH et le résultat est présenté sur la **Figure 49A**.

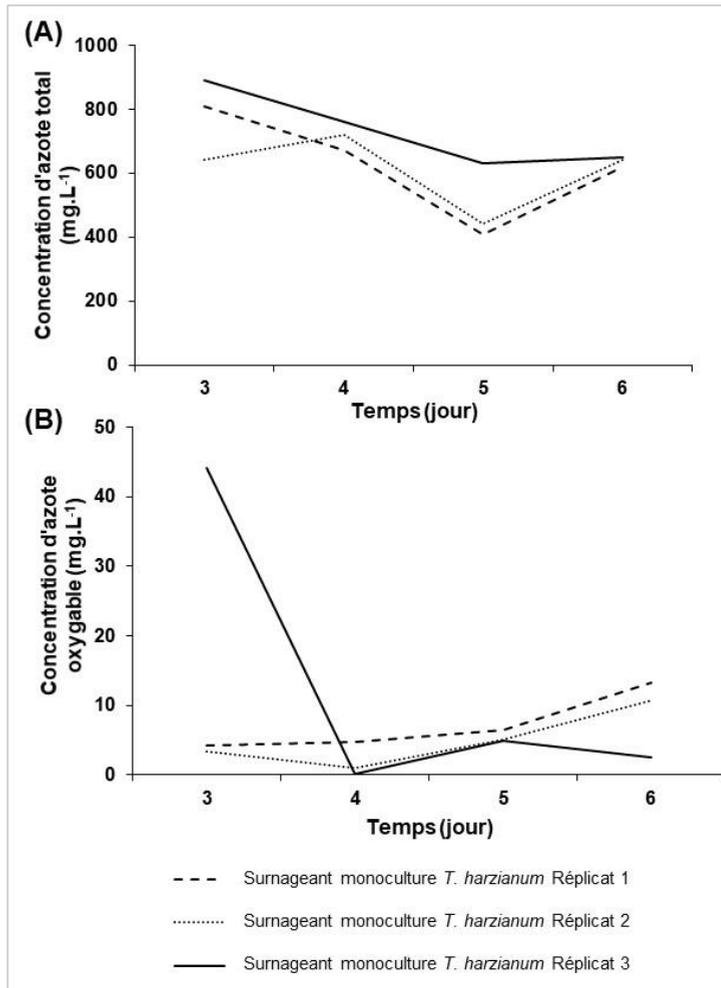


Figure 49 : Concentration d'azote (en mg par litre) dans les surnageants de monoculture de *T. harzianum* prélevés au jour 3, 4, 5 et 6 de culture dans le MN à 30°C (A) par le kit HACH qui permet de doser la concentration d'azote total et (B) par la méthode Kjeldahl qui permet de doser les formes oxydables de l'azote. Ces graphiques représentent les résultats obtenus avec 3 répétitions biologiques.

La concentration d'azote diminue progressivement du jour 3 au jour 5 (valeur moyenne qui baisse de 780 à 490 mg.L⁻¹). Exceptionnellement, la concentration d'azote dans le 2^{ème} répliat augmente de 640 à 720 mg.L⁻¹ entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour de culture. Au 6^{ème} jour, une augmentation de la concentration d'azote est observée (moins accentuée dans le cas du 3^{ème} répliat) pour atteindre une concentration moyenne de 635 mg.L⁻¹.

L'azote sous forme oxydable a été également dosé par la méthode Kjeldahl qui permet de calculer la concentration d'azote organique, la fraction la plus déterminante

pour les dosages d'acides aminés ultérieurs. Par rapport au dosage avec le kit HACH, des concentrations significativement plus faibles d'azote ont été observées (**Figure 49B**). A l'exception du surnageant du 3^{ème} réplikat dans laquelle la concentration d'azote au jour 3 est de 44 mg.L⁻¹, les concentrations dosées dans les autres échantillons restent de l'ordre de moins d'une dizaine de milligrammes par litre.

Le volume requis de surnageant pour atteindre le seuil de détection des acides aminés par HPLC est calculé selon l'équation établie dans la section 6.5 du 2^{ème} chapitre, en se basant sur les résultats obtenus par la méthode Kjeldahl. Ces volumes sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Volume de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 minimal requis pour les dosages HPLC afin d'atteindre le seuil de détection des acides aminés

Jour de prélèvement	Volume de surnageant requis (L)		
	Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 3
3	2,4	2,96	0,24
4	2,1	10,3	13,01
5	1,55	1,96	2,04
6	0,75	0,92	2,5

L'obtention d'une grande quantité de surnageant de champignon étant complexe, un dosage a été effectué avec de moindres volumes. Ce dosage n'a pas permis de détecter les acides aminés éventuellement présents dans le surnageant.

8. Effet de la coculture sur la production de métabolites secondaires

8.1. Echange de métabolites entre *T. harzianum* et *B. velezensis*

Des cocultures de *T. harzianum* IHEM5437 et *B. velezensis* GA1 où chaque souche est séparée par une membrane semi-perméable ont été effectuées pour étudier l'effet de l'échange de métabolites entre ces deux microorganismes sur la production de LPs par la bactérie. Dans un premier temps, la migration de molécules entre l'insert et le puits a été mise en évidence en utilisant un colorant textile fushia. En remplissant le puits ou l'insert avec la solution colorée, celle-ci s'est retrouvée dans l'autre compartiment après moins de 2 h d'incubation.

Une fois le flux entre les deux compartiments du système confirmé, les cocultures ont été réalisées. Après 6 jours d'incubation, des filaments de champignon ont été retrouvés dans l'insert, compartiment dédié à la croissance de la bactérie. Malgré l'ajout d'un filtre de 0,22 µm dans l'insert, le milieu de culture de la bactérie a été contaminé par *T. harzianum*.

8.2. Les métabolites produits par *T. harzianum*

T. harzianum et *B. velezensis* GA1 étant capables de produire des molécules à activité antibactérienne et antifongique en plus des LPs, l'effet de la coculture sur leur production a été déterminé contre certains pathogènes. L'activité du surnageant de la coculture a été comparé uniquement à celle du surnageant de la monoculture de *T. harzianum* car la croissance de *B. velezensis* dans ce milieu n'est pas considérable. Aucune activité antimicrobienne n'a été observée en testant le surnageant de la monoculture et celui de la coculture contre les bactéries *A. tumefaciens*, *X. campestris*, *C. michiganensis*, ni contre le champignon *F. oxysporum*, comme en atteste l'absence de zone d'inhibition de croissance autour des puits (**Figure 50**).

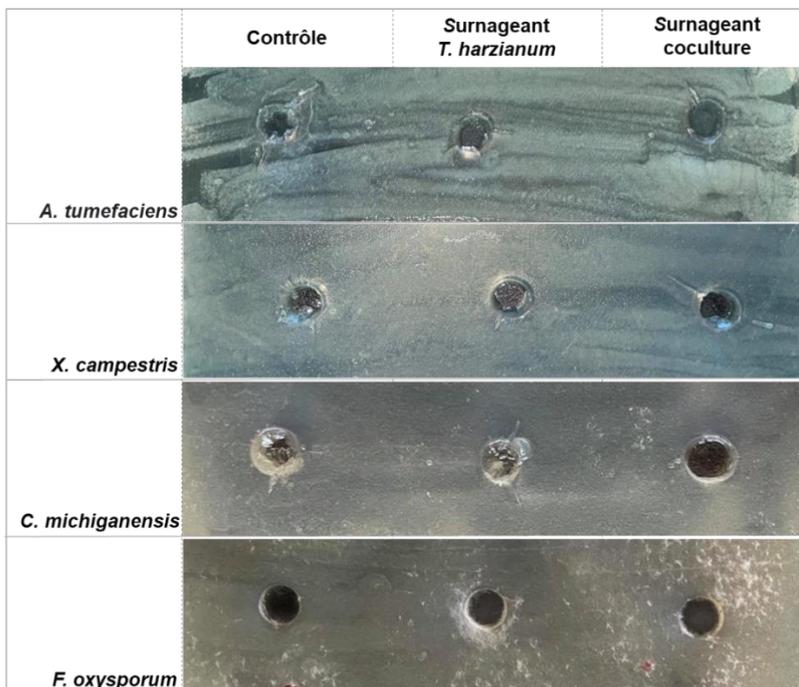


Figure 50 : Détermination de l'inhibition de la croissance de plusieurs phytopathogènes (*A. tumefaciens*, *X. campestris*, *C. michiganensis* et *F. oxysporum*) par la méthode des puits, en présence de 100 μ L de surnageant prélevé d'une monoculture de *T. harzianum* IHEM5437 de 144 h dans le MN ou d'une coculture avec *B. velezensis* GA1 dans le MN après 144 h d'incubation. L'expérience a été effectuée avec 3 répétitions biologiques.

La production de lipopeptides par la bactérie a été suivie en monoculture dans le MN supplémenté par le sulfate d'ammonium, le surnageant de *T. harzianum* à une concentration finale de 90 % et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437.

La supplémentation du milieu de culture avec les différentes solutions a engendré la production des 3 familles de lipopeptides (**Figure 51**).

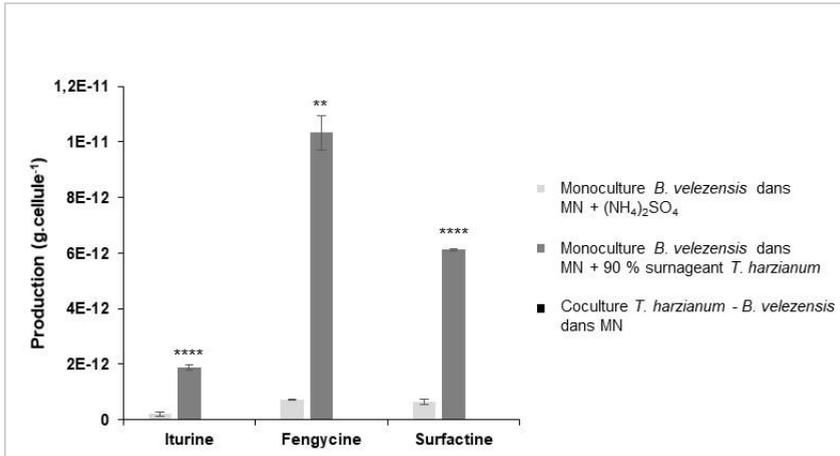


Figure 51 : Quantification par UPLC des lipopeptides (en g par cellule) produits par *B. velezensis* GA1 en monoculture planctonique de 48 h dans le MN supplémenté soit avec 10 mM de sulfate d’ammonium, soit avec 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 provenant d’une monoculture de 144 h, et des lipopeptides produits après 144 h de coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 en MN. Le graphique montre la moyenne et l’écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l’aide du test de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$.

Une production de 0,2 et 1,8 pg.cellule⁻¹ d’iturine est observée respectivement en monoculture supplémentée en sulfate d’ammonium et en surnageant fongique. Des productions de 0,73 et 10 pg.cellule⁻¹ de fengycine, 0,63 et 6,1 pg.cellule⁻¹ de surfactine y ont été dosés respectivement. En coculture, aucune production de lipopeptide n’a été détectée dans le surnageant. Afin d’écartier les possibilités que ces métabolites soient produits à des faibles concentrations ou colocalisés avec le mycélium fongique plutôt que dans le surnageant, une concentration du surnageant de la coculture ainsi qu’une extraction au méthanol à partir de la biomasse fongique ont été réalisées. Aucune trace de ces NRPs n’a été détectée dans les deux cas.

8.3. Effet de *T. harzianum* sur la production de lipopeptides

Les résultats précédents montrent qu’une production de lipopeptides est possible en présence du surnageant de *T. harzianum* mais pas en coculture avec ce champignon. Différentes hypothèses pouvant amener à la non-détection des lipopeptides ont été testées.

Dans un premier temps, le pH des cultures a été mesuré pendant les 6 jours d’incubation. Les lipopeptides pouvant précipiter à un pH inférieur à 6, la tendance du milieu de culture à s’alcaliniser écarte cette possibilité (**Figure 52A**).

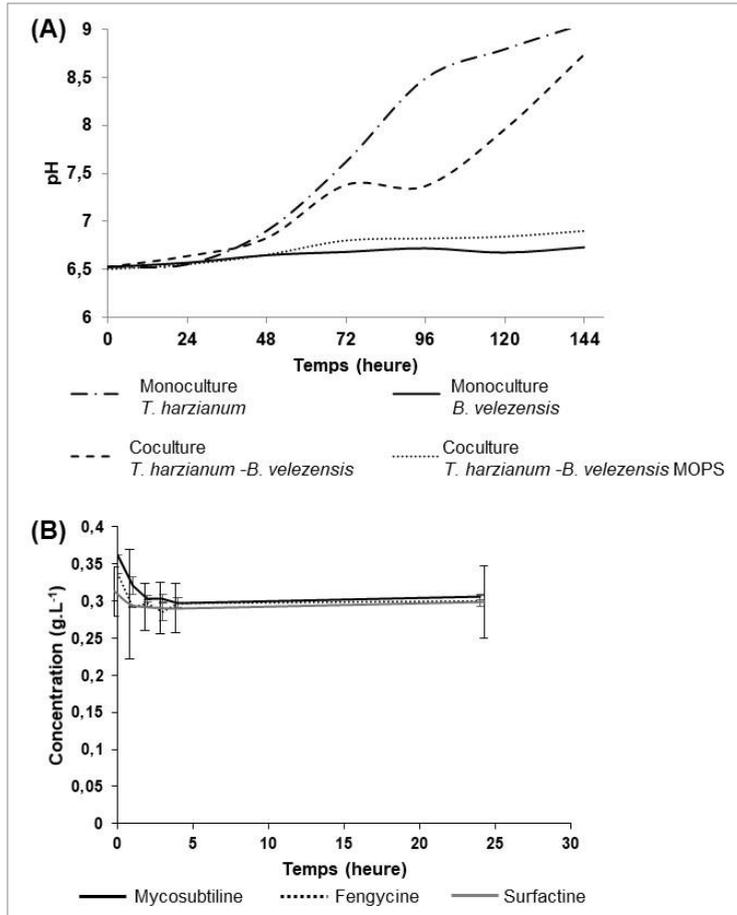


Figure 52 : (A) Suivi du pH des monocultures de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans le MM ainsi que de leur coculture dans ce milieu tamponné ou non avec du MOPS chaque 24 h et pendant 144 h d'incubation à 30 °C avec une agitation de 100 rpm, (B) Suivi par UPLC de la concentration des lipopeptides (suspendus dans une solution de concentration initiale de 0,5 g.L⁻¹) dans un mélange avec du surnageant de *T. harzianum* issu d'une culture de 144 h dans un rapport de 1 : 1 pendant 24 h. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions techniques.

En effet, en coculture, le pH du milieu augmente progressivement de 6,5 à 8,5 à la fin des 6 jours d'incubation. Cette alcalinisation est attribuée principalement à l'action champignon, dont le pH de la monoculture augmente également à 9 après 6 jours. Le pH de la monoculture de *B. velezensis* reste globalement stable, dû à sa très faible croissance. L'ajout du MOPS au MN permet de garder stable le pH à 6,5 pendant toute la durée de l'expérience. Malgré le contrôle de pH, aucun lipopeptide n'a été produit.

Dans un second temps, nous avons vérifié la stabilité des lipopeptides au cours du temps en présence du surnageant de *T. harzianum* afin de déterminer s'il renferme des molécules capables de dégrader les NRPs. Des solutions séparées de surfactine,

fengycine et mycosubtiline ont été préparées et mélangées au surnageant du champignon. Les mélanges ont été incubés pendant 24 h à 30 °C et un dosage par UPLC a été effectué toutes les heures pendant 4 heures et puis à 24 h (**Figure 52B**). Pour les 3 familles de lipopeptides, une petite baisse de la concentration est détectée la première heure mais par la suite celle-ci demeure stable jusqu'à 24 h d'incubation.

Dans un troisième temps, l'expression des gènes des iturines, fengycines et surfactines synthétases chez *B. velezensis* GA1 a été étudiée dans la monoculture en présence de 90 % du surnageant de *T. harzianum* et en coculture avec ce même champignon. L'expression dans ces deux conditions a été comparée à celle dans le milieu riche TY.

Puisque la croissance de la bactérie n'est pas similaire dans les 3 cultures différentes (croissance plus rapide dans le milieu riche), un suivi de DO_{600nm} a permis d'analyser l'expression des gènes à la même phase de croissance, c'est-à-dire à la fin de la phase exponentielle (**Figure 53**).

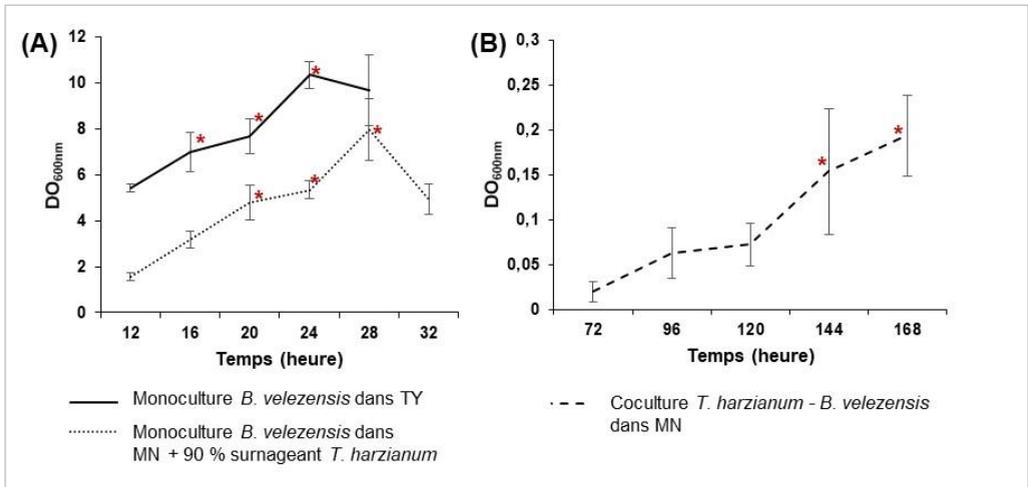


Figure 53 : Cinétique de croissance de *B. velezensis* GA1 (DO_{600nm}) (A) en monoculture dans le milieu TY et dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 issu d'une culture de 144 h sur ce même milieu MN et (B) en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN, les étoiles rouges correspondent aux heures de prélèvement pour l'analyse par RT-qPCR. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques.

En monoculture dans le TY, une analyse de RT-qPCR a été réalisée sur les prélèvements aux heures 16, 20 et 24 h de culture, permettant à une DO_{600nm} de 10 d'être atteinte. Dans le MN supplémenté avec le surnageant du champignon, la phase exponentielle s'achève à 28 h de culture dans laquelle la bactérie s'est développée jusqu'à une DO_{600nm} de 7,9 (**Figure 53A**). L'analyse de l'expression des gènes a été effectuée sur cet échantillon ainsi que sur ceux prélevés à 20 et 24 h. En coculture, le suivi de croissance a été fait sur une base quotidienne étant donné la croissance lente

de la bactérie. Les prélèvements de 144 et 168 h ont été utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes codants pour les LPs synthétases (**Figure 53B**).

L'expression de ces gènes a été étudiée en utilisant le gène de la gyrase comme référence pour normaliser la quantité d'ARN entre les différentes conditions. Le niveau d'expression des 3 gènes des synthétases chez *B. velezensis* GA1 en monoculture dans le TY à 24 h est définie comme référence (RQ fixé à 1) pour la comparaison avec les résultats obtenus dans les autres conditions.

Le gène codant pour la synthétase d'iturine est 2 fois plus exprimé en monoculture dans TY à 20 h de culture par rapport à 16 et 24 h dans ce même milieu. Le niveau d'expression est similaire dans les trois échantillons dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de *T. harzianum* (RQ de 1, 0,75 et 1 à 20 h, 24 h et 28 h respectivement). En coculture avec le champignon, l'expression de ce gène est réprimée. Des RQ de 0,02 sont calculés à 144 h et 166 h (**Figure 54A**).

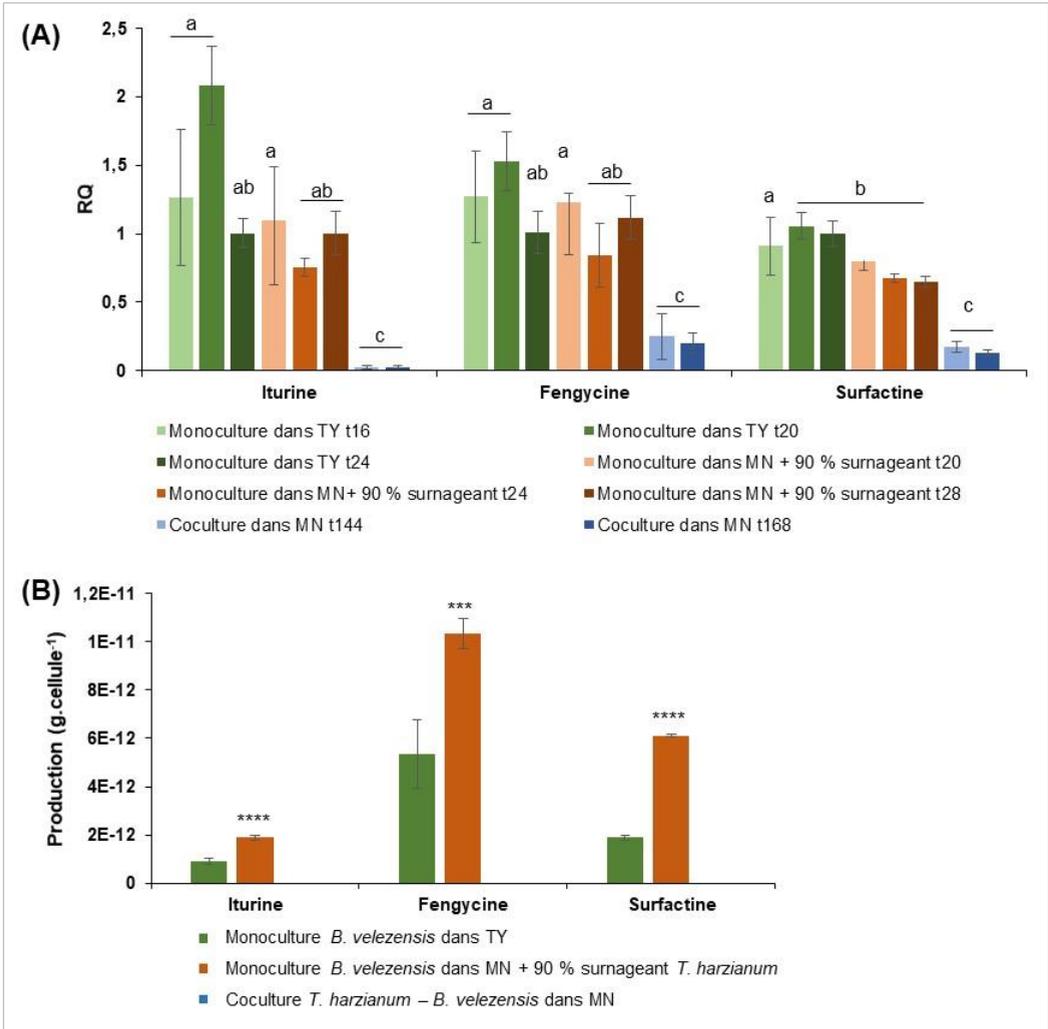


Figure 54 : (A) Niveau d'expression (RQ qui correspond à la valeur $2^{-\Delta\Delta Ct}$) des gènes codants pour les synthétases d'iturine, de fengycine et de surfactine chez *B. velezensis* GA1 en monoculture dans le milieu TY et dans le MN supplémenté de 90 % de surnageant de *T. harzianum* IHEM5437 issu d'une culture de 144 h et en coculture avec *T. harzianum* IHEM5437 dans le MN, déterminé par RT-qPCR. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiquement différents (ANOVA à sens unique et test HSD de Tukey) (significativement différent, $\alpha < 0,05$), (B) Quantification (en g par cellule) par UPLC des lipopeptides produits dans ces mêmes conditions. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de trois répétitions biologiques. La significativité de la différence est calculée à l'aide du test de t de Student où « ns » signifie aucune différence significative ; « * », $P < 0,05$; « ** », $P < 0,01$; « *** », $P < 0,001$; « **** », $P < 0,0001$.

L'expression du gène codant pour la synthétase de fengycine est similaire dans toutes les conditions de monoculture sur TY et sur MN avec le surnageant fongique. Une inhibition de la synthèse a été constatée en coculture où les RQ sont de 0,25 et 0,19 à 144 h et 168 h respectivement (**Figure 54A**).

Un même niveau d'expression du gène codant pour la synthétase de surfactine a été observé à 16, 20 et 24 h en monoculture dans le TY. Cette expression est plus faible (RQ autour de 0,65) dans le MN supplémenté en surnageant de champignon. Comme pour les autres gènes codants pour des synthétases de LPs, ceux codant pour la synthétase de surfactine sont sous-exprimés en coculture. Les RQ dans cette condition de culture sont de 0,17 à 144 h et 0,13 à 168 h (**Figure 54A**).

La production de LPs dans ces 3 conditions de culture a été suivie par UPLC. En monoculture dans le TY, *B. velezensis* GA1 a produit 0,92 pg.cellule⁻¹ d'iturine, 5,3 pg.cellule⁻¹ de fengycine et 1,8 pg.cellule⁻¹ de surfactine. En monoculture dans le MN en présence du surnageant de *T. harzianum*, 1,8 pg.cellule⁻¹ d'iturine, 10 pg.cellule⁻¹ de fengycine et 6,1 pg.cellule⁻¹ de surfactine ont été produits, comme décrit dans la section précédente. En coculture, il est confirmé qu'aucun lipopeptide n'est détecté dans le milieu de culture (**Figure 54B**).

Chapitre 4

Discussion

L'étude de deux microorganismes ou plus en coculture pose deux problématiques majeures. La première, la plus évidente, est de parvenir à mettre au point un milieu de culture et un mode d'inoculation propice au développement des deux souches, sans que l'une des deux ne prennent l'ascendant sur l'autre. La seconde problématique consiste à mettre au point des méthodes d'analyses permettant de suivre la croissance des deux microorganismes se développant dans un environnement physique commun, ainsi que la production de leurs métabolites respectifs.

1. Quantification des microorganismes dans un biofilm mixte en coculture par qPCR

Pour répondre à cette seconde problématique, nous avons développé au cours de cette étude une méthode basée sur la quantification par qPCR des deux espèces. Cette approche a déjà prouvé son efficacité pour la quantification de levures, de bactéries et de champignons [359–361]. En particulier, des méthodes de quantification des bactéries du genre *B. velezensis* et des champignons du genre *Trichoderma*, utilisant la qPCR, ont déjà été décrites [359,362]. Ces études ont permis de déterminer le taux de croissance de ces microorganismes sur les plantes sans avoir à les cultiver *in vitro*. Un autre avantage que présente cette méthode est la spécificité vis-à-vis de l'espèce ciblée (si les bonnes amorces sont utilisées), la rapidité et la reproductibilité [360]. Toutefois, le développement d'une telle approche nécessite plusieurs calibrations, afin de pouvoir corréler le résultat final au matériel génétique de départ.

Pour la première fois, cette technique a été appliquée sur un mélange de *B. velezensis* et *T. harzianum*. Quand la quantification se rapporte à des ADN différents dans un mélange, la qPCR permet de refléter les proportions relatives de chaque souche et non la quantité exacte de chacune. Même si le Ct obtenu est bien proportionnel à la concentration d'ADN provenant d'une espèce, sa valeur n'est pas conservée pour la même concentration d'ADN d'une autre espèce. Ces biais de qPCR sont souvent reliés à la taille du génome et sa composition en GC [363,364]. Bien qu'elle paraisse prometteuse dans la détermination de l'abondance relative de chaque espèce dans les biofilms mixte, cette technique reste encore à développer. En effet, plusieurs problèmes se sont présentés avec notamment des difficultés à obtenir une concentration d'ADN proportionnelle à la biomasse de *B. velezensis*. Cette bactérie est connue pour son aptitude à former des biofilms riches en EPSs. Ces substances comportant des polysaccharides, des lipides, des protéines et des substances humiques peuvent se lier aux acides nucléiques et impacter la qualité et la quantité de l'ADN extrait [365–367]. Cet élément permet d'expliquer la variabilité observée dans la quantité d'ADN obtenue à partir de biomasses similaires. Il est possible de contourner cet obstacle en ajoutant, en amont de la lyse cellulaire, une étape qui consiste à lyser et éliminer les EPSs et les éléments pouvant interférer dans l'extraction de l'ADN [368].

Un second problème mis en évidence au cours du développement de cette approche est la contamination croisée des échantillons. Malgré les répétitions effectuées et l'utilisation de nouvelles solutions d'amorces, la résolution du problème de contamination entre les échantillons quand *B. velezensis* et *T. harzianum* sont manipulés ensemble n'a pas été concluante.

Par conséquent, cette approche n'a pas été retenue pour la quantification de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437. Une des alternatives envisagée et appliquée consistait à séparer les microorganismes en fonction de leur taille lorsqu'ils sont cultivés en mode planctonique et d'exprimer la croissance de la bactérie en densité optique (ou concentration cellulaire) et le champignon en matière sèche. Lorsqu'ils sont en coculture, immobilisés sur support, la quantification de la bactérie a été faite dans la phase planctonique uniquement et celle du champignon dans la partie attachée sur le support.

2. Le pH et la vitesse d'agitation, paramètres clés influençant l'attachement des microorganismes sur le support

Deux conditions de coculture ont été envisagées comme indiqué précédemment : planctonique et immobilisée sur support. L'idée de l'utilisation du support est inspirée par le fait que ces microorganismes se développent sur les racines de plantes, lorsqu'ils sont dans leur habitat naturel. L'immobilisation des microorganismes permettra ainsi de rapprocher leurs caractéristiques de croissance et de production à celles observées en conditions naturelles dans la rhizosphère. Le support utilisé au cours de cette étude est inerte, constitué par des treillis ondulés en acier inoxydable. Il est déjà exploité pour ses avantages dans l'induction de la production de métabolites d'intérêt ainsi que leur purification à partir du milieu de culture [351,369,370].

Le champignon filamenteux *T. harzianum* est capable de s'attacher facilement à ce support avec ses hyphes qui pénètrent dans les mailles et y adhèrent. Ceci a également été démontré par Khales *et al.* (2014) en bioréacteur avec *T. reesei* où la production de l'hydrophobine a été améliorée grâce à l'utilisation de ce support [371]. Par rapport à sa croissance en phase planctonique, *T. harzianum* présente une plus grande surface d'échange avec les phases liquide et gazeuse [372]. La consommation de nutriments à partir du milieu de culture est favorisée, ainsi que la consommation de l'oxygène grâce à l'alternance des phases de submersion et de non-submersion dans le liquide. Les pellets produits en culture en condition planctonique entraînent une limitation nutritionnelle et respiratoire aux hyphes développés dans la région centrale [373]. Pour cette raison, la consommation de glucose par *T. harzianum* est plus rapide en culture immobilisée.

La formation de biofilm par *B. velezensis* sur ce support s'avère être moins évidente. En effet, les bactéries du genre *Bacillus*, non filamenteuses et productrices de lipopeptides ont montrées de plus faibles capacités d'adhésion sur ce support métallique [374]. L'attachement de *B. subtilis* 168 a été amélioré par des

manipulations génétiques qui ont permis de rendre cette bactérie filamenteuse et de lui conférer la capacité de produire des biofilms plus robustes [375]. Plusieurs paramètres peuvent affecter l'attachement des cellules sur le support y compris l'hydrophobicité de ce dernier et sa tension de surface. Les bactéries tendent à s'attacher plus facilement sur les surfaces hydrophobes [376]. L'utilisation d'un support avec une surface hydrophile limite l'accrochage et la formation de biofilm [377].

L'augmentation de la capacité d'attachement des cellules de *B. velezensis* sur le mycélium fongique par rapport au support peut s'expliquer par leur degré d'hydrophobicité. Shakerifard *et al.* (2009) a démontré que les cellules de *B. cereus* et le support en acier inoxydable possèdent des hydrophobicités opposées [378]. L'attachement des bactéries au support hydrophile est alors défavorisé. La formation de biofilm de *T. harzianum* sur le support rend la surface plus hydrophobe et améliore l'attachement des cellules bactériennes [379]. L'ampleur de l'adhésion des bacilles sur *T. harzianum* varie en fonction du mode de coculture. En condition planctonique, dans laquelle le champignon forme des pellets, la bactérie s'y attache en plus faible quantité, sans formation de biofilms. Les pellets constituent des amas de mycéliums très compacts qui se forment suite au mouvement causé par l'agitation de la culture. L'adhésion des bactéries sur les champignons a déjà été constatée dans plusieurs études [281]. Cette aptitude dépend de plusieurs facteurs comme la viabilité du champignon, son stade de croissance et la région à coloniser. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* s'attache préférentiellement sur le mycélium de *Candida albicans* et non pas sur les spores de cette levure [380]. En ce qui concerne *B. velezensis*, Artursson et Jansson (2003) ont démontré que l'attachement de *B. velezensis cereus* VA1 est favorisé sur les hyphes dégradés [381]. Par ailleurs, l'attachement de *B. subtilis* sur certaines régions des filaments d'*Aspergillus niger* peut s'expliquer par l'hétérogénéité de production de protéines par ce champignon. Ainsi, les zones produisant plus de protéines attirent davantage les bactéries [281]. L'accessibilité plus élevée de *B. velezensis* GA1 aux filaments de *T. harzianum* développés sur support induit un meilleur attachement dans cette condition de coculture.

D'autres paramètres physico-chimiques influencent l'attachement des microorganismes sur le support. Il est essentiel notamment de trouver une vitesse d'agitation qui permet la formation d'un biofilm stable au cours de la culture. L'agitation du système de culture permet l'aération, l'homogénéisation du milieu de culture et empêche le dépôt des microorganismes au fond ou à la surface du liquide. La vitesse d'agitation peut impacter le degré d'attachement et la stabilité des microorganismes non motiles sur le support par la force de cisaillement qu'elle impose sur sa surface [382]. En effet, à partir d'une certaine vitesse, les cellules sont incapables de s'attacher solidement au support. La vitesse qui permet la formation d'une plus grande biomasse de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* doit alors être déterminée afin d'optimiser la croissance de ces deux souches en présence du support. Ainsi, la vitesse d'agitation a été fixée à 100 rpm.

Parmi les paramètres physico-chimiques étudiés, nous retrouvons le pH du milieu de culture. L'effet de ce paramètre a par exemple été mis en évidence dans le cadre de l'étude de Vassaux *et al.* (2019) qui a démontré que le contrôle du pH de la culture du champignon *Cyanoderma asteris* a fortement réduit sa capacité à se développer et à former des biofilms sur le support métallique utilisé [351]. L'effet de ce paramètre a donc été étudié dans le cadre du développement de biofilm de *B. velezensis* GA1 sur le support. Cet attachement n'étant pas optimal dans les conditions de culture sans contrôle de pH, l'effet du maintien de celui-ci à une valeur optimale pour la croissance de cette bactérie a été examiné. L'analyse a permis de conclure que dans le cas étudié ici, l'attachement de la souche GA1 sur le support est indépendant de la régulation de pH. D'autre part, la formation d'une plus grande quantité de biomasse est dépendante de la capacité du champignon à se développer dans le pH du milieu qui varie au cours de la culture. En effet, les microorganismes modifient le pH de leur milieu de culture (acidification ou alcalinisation) par les réactions biochimiques qu'ils génèrent ainsi que par leur sécrétome. Leur croissance est ensuite influencée par ce changement en fonction de leur pH optimal de croissance. Par exemple, la croissance de la bactérie *Lactobacillus plantarum* induit l'acidification du milieu et puisque sa croissance est favorisée à des pH faibles, son développement est par la suite favorisé [383]. En résumé, les conditions de pH non contrôlées sont préférables pour la croissance de *B. velezensis* sans exercer une influence sur son attachement sur le support. Par conséquent, le pH des cultures n'a pas été contrôlé.

3. Développement de stratégies de coculture

Les modes de culture planctonique et immobilisée sur support ont été utilisés dans les deux approches de coculture développées au cours de cette étude. Ces approches ont fait appel à deux milieux de culture différents. L'effet des milieux de culture sur la coculture sur boîtes de Pétri des microorganismes a été mis en évidence dans les travaux d'Izquierdo-García *et al.* (2020) [349]. L'interaction entre *T. virens* GI006 et *B. velezensis* BS006 varie selon la composition du milieu de culture. La croissance du champignon est complètement inhibée par la bactérie dans un milieu riche synthétique (LB et PDA), mais pas dans un milieu où la croissance de cette dernière est ralentie. Ces résultats n'ont jamais été démontrés en coculture liquide. Dans cette étude, nous avons sélectionné un milieu riche et un milieu chimiquement défini contenant le nitrate comme seule source d'azote afin d'y comparer la croissance de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 en monoculture et en coculture. L'influence du milieu utilisé sur l'interaction entre ces microorganismes et l'activité de biocontrôle, déterminée en termes de production de lipopeptides par *B. velezensis*, a été analysée. Les principaux résultats sont présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans les différentes conditions de culture de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437

Milieu de culture	Milieu riche TY			Milieu minimum	
Type de culture	Monoculture	Coculture avec inoculation simultanée	Coculture avec inoculation séquentielle	Monoculture	Coculture avec inoculation simultanée
Croissance de <i>Bacillus</i>	+	+	+	-	+
Croissance de <i>Trichoderma</i>	+	-	+	+	+
Type d'interaction	Compétition / amensalisme			Coopération	
Production de lipopeptides	+	+	+	-	-

3.1. Milieux de culture sélectionnés en fonction des sources de nutriments

Le milieu riche TY utilisé est un milieu synthétique et conventionnel pour la culture des bactéries et des champignons [281] et qui renferme tous les éléments nutritifs nécessaires au développement des deux microorganismes d'intérêt. Le milieu chimiquement défini a été sélectionné à la suite d'analyses métaboliques via la base de données KEGG, afin de défavoriser la croissance de la bactérie. En effet, les analyses de génomique et de métabolomique ont permis de dévoiler les complémentarités métaboliques entre les microorganismes d'intérêt. L'absence de certaines fonctions de biosynthèse chez le premier, empêchant ainsi sa croissance en monoculture, pourra être compensé par la présence du second en coculture [384].

La capacité des souches du genre *B. velezensis* et *T. harzianum* à assimiler différentes sources d'azote a été étudiée. Les premiers résultats montrent que *B. velezensis* est incapable d'utiliser le nitrate comme unique source d'azote à cause de l'absence de la nitrite réductase, contrairement à *T. harzianum*. Cette enzyme est essentielle pour la conversion du nitrate ou du nitrite en ammonium pour la biosynthèse des acides nucléiques et des acides aminés [310]. Ainsi, le nitrate a été choisi comme source d'azote employée dans ce second milieu de culture appelé milieu nitrate, dans l'objectif de restreindre son utilisation au champignon dans la coculture.

3.2. Croissance en monocultures favorisée dans le milieu TY par rapport au MN

En monocultures dans le TY, *T. harzianum* IHEM5437 et *B. velezensis* GA1 se développent de manière optimale. L'utilisation du support dans la monoculture de *T. harzianum* permet d'avoir une biomasse plus importante à la fin de l'incubation par rapport à la monoculture en condition planctonique. La croissance des champignons immobilisés sur un support améliore la production de biomasse, comme dans le cas

de *Cyanodermella asteris* où 39 % de biomasse en plus est générée dans la culture immobilisée [351]. Le rendement en biomasse par rapport à la consommation de nutriment, et la production de protéines sont plus élevés dans cette condition [351]. En ce qui concerne *B. velezensis*, la biomasse est répartie entre la phase planctonique et le support dans la monoculture immobilisée. La DO_{600nm} obtenue dans la phase planctonique est égale à la moitié de celle observée en monoculture en condition planctonique. Néanmoins, nous ne pouvons pas considérer que la croissance de *B. velezensis* est plus faible en présence d'un support puisqu'une partie de la biomasse, attachée au support, n'a pas pu être quantifiée indépendamment de la biomasse fongique.

En comparaison avec le milieu nitrate, le champignon a le même comportement physiologique (développement sous forme de pellets en condition planctonique ou complètement attaché sur le support en condition immobilisée) mais avec un taux de croissance plus faible. Ce ralentissement de la vitesse de croissance s'explique par la forme de la source d'azote disponible. En effet, bien que *Trichoderma* puisse assimiler le nitrate, cette source d'azote n'est pas la source optimale pour sa croissance [385]. La formation de biomasse est plus importante quand l'ammonium est utilisé comme source d'azote. Dans cette condition, 227 mg de biomasse ont été obtenus en comparaison avec 100 mg en présence du nitrate. La consommation de l'ammonium engendre l'acidification du milieu qui devient plus adapté à la croissance du champignon. Les sources d'azote organiques tels que les caséines et les peptones favorisent aussi la croissance de *T. viride* avec un développement plus important que ceux obtenus en utilisant le nitrate [386]. Quant à *B. velezensis*, sa croissance dans le MN est très faible. En suivant l'évolution de la croissance cellulaire, la concentration de *B. velezensis* en culture planctonique a augmenté de 10 fois uniquement après 6 jours de culture (qui correspond à une matière sèche de 1,6 mg dans 1 L de culture) et de 100 fois en présence du support, en comparaison à une croissance de 10^7 fois dans le milieu TY. Il a été constaté qu'une légère croissance de *B. velezensis* est présente malgré l'absence d'une source d'azote assimilable. Cette croissance peut s'expliquer par la présence d'impuretés dans les produits utilisés dans le milieu de culture, et en particulier le nitrate de sodium, qui peuvent contenir des traces d'azote sous forme assimilable par *B. velezensis*. Sachant que l'azote constitue 12 % de la matière sèche de *Bacillus*, la formation de 1,6 mg de matière sèche nécessite un apport de 0,19 mg d'azote assimilable dans le milieu de culture. Ce milieu contient 5,9 g de nitrate de sodium ayant une pureté ≥ 99 %. Ainsi, un apport approximatif de 59 mg d'impuretés est largement suffisant pour assurer la croissance de la bactérie en monoculture dans le MN. La différence de croissance observée en condition immobilisée sur support peut être expliquée par la présence de reste de matière organique sur le support recyclé. Cette matière aurait résisté au nettoyage préalable du support.

L'utilisation du nitrite comme unique source d'azote n'a pas permis la croissance de la bactérie en monoculture, car la souche GA1 est incapable d'assimiler cette forme d'azote minérale comme mentionné dans KEGG. Quant à l'ammonium ou les sources organiques d'azote, et d'après KEGG, ils peuvent être utilisés par *B. velezensis*. Ce

résultat a été confirmé par la croissance de la bactérie dans le MN supplémenté de sulfate d'ammonium ou de casaminoacides. La substitution totale du nitrate par l'ammonium dans le MN provoque une croissance de *B. velezensis* supérieure à celle observée quand le milieu contenant le nitrate et l'ammonium simultanément. Cette observation n'est pas due à la régulation de l'assimilation de l'ammonium en présence du nitrate mais à la concentration d'ammonium plus élevée dans la condition de culture où le nitrate est complètement substitué par l'ammonium (35 mM d'ammonium contre 10 mM). En résumé, *T. harzianum* est capable de se développer dans le TY et le MN, à l'inverse de *B. velezensis* dont la croissance est limitée dans le MN par la source d'azote utilisée.

Afin de détecter la présence d'un stress potentiel chez *B. velezensis* lié au manque de la source d'azote, la vitalité et l'état métabolique des cellules ont été déterminés en utilisant des réactifs fluorescents combinés à la cytométrie en flux. Le PI est un intercalant de l'ADN cellulaire. Pour y accéder, la membrane de la cellule doit être suffisamment perméable [387]. Par conséquent, le PI ne peut pas accéder aux cellules vivantes ayant des membranes imperméables. Cette approche est utilisée dans l'étude des cycles cellulaires et de l'apoptose [388]. En monoculture dans le MN, aucune cellule de *B. velezensis* n'est fluorescente, elles sont donc toutes considérées comme vivantes. En ce qui concerne leur état métabolique, le réactif RSG permet de détecter leur activité de réduction et reflète ainsi les modifications dans l'activité de transfert d'électron [389]. L'utilisation du RSG est dédiée à l'étude de l'impact de facteurs variés sur l'activité métabolique des cellules [390]. Les cellules de *B. velezensis* sont en majorité non actives métaboliquement au début et à la fin de la monoculture en conditions planctonique ou attachée au support. Les cellules bactériennes présentent donc un stress lié à l'absence d'une source d'azote, essentielle pour leur développement. L'apparition d'une activité métabolique chez une partie de la population en cours de la culture peut être reliée à l'activation des chaînes de transporteurs d'électrons suite à la libération d'une source d'azote provenant des cellules elles-mêmes.

3.3. Croissance en cocultures favorisée dans le MN par rapport au TY

Des stratégies différentes ont été développées pour la coculture de ces deux microorganismes selon le milieu utilisé. Les résultats principaux obtenus sont résumés dans la **Figure 55**.

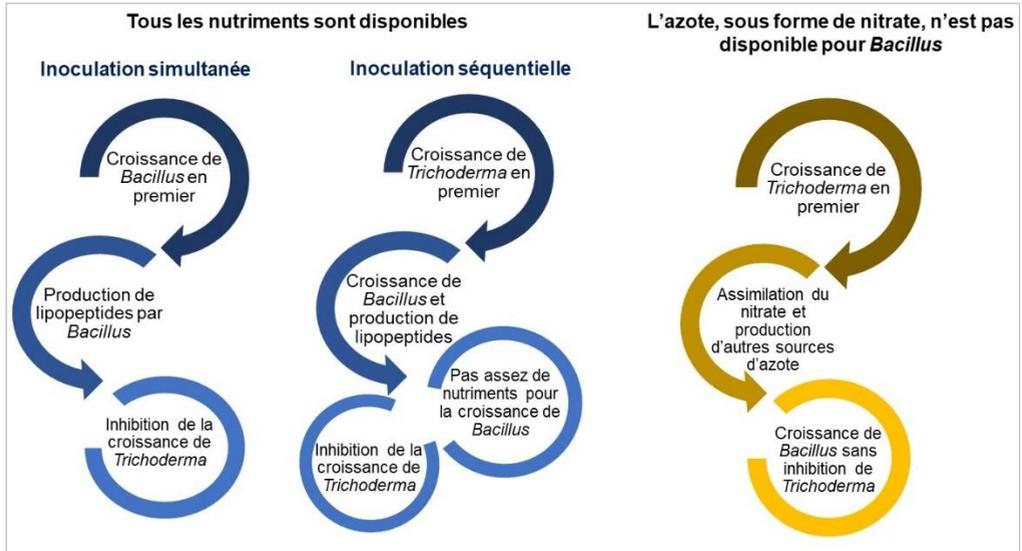


Figure 55 : Récapitulatif des modalités d'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 dans les différentes stratégies de coculture

3.3.1. Amensalisme de *B. velezensis* vis-à-vis de *T. harzianum* en coculture en milieu riche TY

En milieu riche, l'inhibition de la croissance des champignons du genre *Trichoderma* par *Bacillus* a été rapportée à plusieurs reprises [344–346,348]. Cette inhibition est principalement due au rythme de développement très rapide de la bactérie d'une part, et à la production de molécules antifongiques de l'autre part. En effet, les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour la production de nombreux métabolites dotés d'une activité antifongique [391]. Parmi ces métabolites, les lipopeptides, et en particulier ceux de la famille des fengycines et des iturines, sont exploités pour leur efficacité dans l'inhibition de la croissance des champignons pathogènes [44,157,164]. À titre d'exemple, leur activité a été démontrée contre *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* et *Bipolaris maydis* [165,392,393]. L'inhibition des champignons du genre *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viridescens* et *Trichoderma* sp) par des souches de *Bacillus* a aussi été décrite dans les études de Kim *et al.* (2008) et Knight *et al.* (2018) [394,395]. Dans la seconde étude, cette inhibition a été attribuée à la production de lipopeptides par la souche de *B. subtilis* utilisée. Ces NRPs présentent un effet direct sur la croissance de *Trichoderma*. En effet, les extraits bruts de lipopeptides provenant de plusieurs souches de *Bacillus* productrices (*B. velezensis* FZB42, *B. subtilis* NH-100 et *B. atrophaeus* 176s) inhibent la croissance de *T. atroviride* [396]. La souche *B. velezensis* GA1, exploitée dans ce projet, produit des lipopeptides de la famille des iturines, fengycines et surfactines [120].

Dans notre étude, cette activité antagoniste a été vérifiée, dans un premier temps, par l'activité directe de *B. velezensis* et ses mutants sur la croissance du champignon

sur boîte. Ce type de test de confrontation est largement utilisé pour étudier l'interaction entre différents microorganismes, avec une possibilité de contrôle des conditions physico-chimiques telles que la température [397]. Dans le biocontrôle, les tests de confrontation permettent d'évaluer l'activité inhibitrice de croissance du BCA vis-à-vis du pathogène et par la suite de déterminer la cible la plus sensible au traitement [398]. En particulier, l'effet d'une certaine activité peut être décrypté en utilisant des mutants qui surexpriment ou n'expriment pas les gènes responsables de ce caractère [399]. Dans son étude, Kulimushi (2017) a analysé, en utilisant des mutants de *Bacillus* qui produisent différentes combinaisons de LPs, l'effet de ces derniers sur l'inhibition de *Rhizomucor variabilis*, champignon pathogène du maïs. Ces résultats ont confirmé que la fengycine constitue le LP le plus efficace contre ce pathogène [400]. Dans la présente étude, l'effet des différents lipopeptides et des combinaisons de ces lipopeptides sur la croissance de *T. harzianum* a été testé par confrontation de ce champignon avec divers mutants de *B. velezensis* GA1. L'absence de production de lipopeptides éradique l'activité inhibitrice de *Bacillus*, impliquant le contact des hyphes du champignon et des colonies de la bactérie. La moindre production d'un ou de deux lipopeptides entraîne l'inhibition de la croissance du champignon à différents degrés, dépendant de la nature du lipopeptide produit. La plus forte inhibition a été observée avec le mutant produisant la fengycine et l'iturine simultanément, avec une très faible baisse par rapport à la souche sauvage. La fengycine et l'iturine sont ainsi les LPs les plus impliqués dans l'activité antifongique de *B. velezensis*, avec une plus grande activité notée avec l'iturine. Ce résultat a été confirmé par les mutants de la souche GA1 qui produisent uniquement un type de LP, où les inhibitions les plus importantes ont été observées avec ceux produisant l'iturine et la fengycine respectivement. Toutefois, l'inhibition par les doubles mutants reste plus faible par rapport à celle obtenue par les mutants simples, attestant d'une activité synergique de la fengycine et l'iturine. Ces deux LPs produits par *B. velezensis* Y6 et F7, ont également été sélectionnés comme les métabolites ayant l'activité antifongique la plus importante contre *R. solanacearum* et *F. oxysporum* [401].

En addition des LPs, *B. velezensis* GA1 produit une panoplie de métabolites à activité antifongique. Ceux-ci peuvent interférer dans les tests de confrontation. L'activité spécifique de chacun de ces LPs a donc été contrôlée par l'addition individuelle de solutions contenant l'iturine, la fengycine ou la surfactine à la monoculture de *T. harzianum*. La mycosubtiline a été utilisée comme LP de la famille des iturines. A l'issue de cette expérience, le LP de la famille des iturines s'est avéré être le LP antifongique le plus puissant avec une inhibition totale de la croissance du champignon, suivie par la fengycine. L'activité antifongique de la surfactine est la plus faible. Dans les tests de confrontation, l'écart entre l'activité antifongique de la fengycine et l'iturine est moins marqué que quand ces LPs sont ajoutés séparément à la culture du champignon. En effet, la mutation sur les gènes impliqués dans la biosynthèse d'un lipopeptide est parfois compensée par la surproduction d'un autre lipopeptide afin de maintenir une activité antifongique suffisante. Par exemple, une surexpression du cluster codant pour la synthétase de fengycine a été décelée chez les

mutants de *B. velezensis* Y6 ne produisant pas d'iturine pour compenser ce déficit [401].

3.3.2. L'inoculation séquentielle dans le milieu TY, une stratégie permettant d'amorcer l'amensalisme entre *B. velezensis* et *T. harzianum*

Pour éviter l'effet antagoniste résultant de la production de lipopeptides par *B. velezensis*, une stratégie de coculture de *Bacillus* et *Trichoderma* basée sur l'inoculation séquentielle a été envisagée. Dans cette stratégie, le microorganisme à la croissance la plus lente est inoculé en avance pour lui laisser le temps de se développer avant d'ajouter le second microorganisme. Ainsi, la persistance et la dominance de la première souche dans les premières étapes de la coculture sont garanties. Cette approche a par exemple permis d'établir une coculture entre *T. asperellum* et *B. amyloliquefaciens* dans les travaux de Karuppiah *et al.* (2019) [345]. La croissance de *T. asperellum* est possible en coculture uniquement quand l'inoculum provient d'une préculture de 24 ou 48 h. Dans le cadre de notre étude, cette approche a été adoptée pour la coculture dans le milieu TY. Une coexistence de *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM est observée en coculture uniquement avec inoculation séquentielle, l'inoculation simultanée entraînant l'inhibition du champignon par *Bacillus*. L'ajout de *B. velezensis* 24 h après celle de *T. harzianum* inhibe la croissance du champignon. En monoculture, ce dernier atteint sa masse maximale après 48 h. Or quand la bactérie est ajoutée à une culture de champignon de 24 h, une très faible augmentation de la matière sèche fongique est constatée à 48 h. Cette augmentation est majoritairement causée par l'attachement de *B. velezensis* sur le biofilm fongique. La bactérie s'est développée également dans la phase planctonique de la coculture de manière similaire à ce qui a été observé en monoculture. Quand *B. velezensis* est inoculé 48 h après *T. harzianum*, une légère augmentation de la biomasse attachée sur le support a été observée, principalement due à l'adhésion de la bactérie sur le champignon et à l'arrêt de la croissance de ce dernier. La croissance de la bactérie dans la phase planctonique est moins prononcée que dans les autres conditions de culture. De plus, nous avons remarqué une augmentation progressive de la DO_{600nm} jusqu'à 72 h après l'inoculation de *B. velezensis* uniquement dans cette condition d'inoculation. La principale raison expliquant cette faible croissance est l'épuisement des nutriments du milieu de culture par le champignon qui s'y développe depuis 48 h. Ce phénomène n'est pas observé dans l'étude de Karuppiah *et al.* (2019) dans laquelle le champignon est précultivé dans une autre culture puis inoculé avec *B. velezensis* dans un milieu frais [345]. La croissance ultérieure de *B. velezensis*, après 72 h de coculture avec *T. harzianum*, a été attribuée à la consommation des dérivés du champignon, que ce soient les molécules produites ou les débris générés après sa dégradation. Cette dégradation est par ailleurs facilitée par la production d'enzymes par *Bacillus* sp., comme la chitinase, qui entraînent la dégradation de la paroi fongique et la libération du contenu des cellules [402].

Pour conclure sur ce point, la coculture avec inoculation séquentielle a permis la coexistence des deux microorganismes étudiés surtout quand la bactérie est ajoutée 24 h après le champignon. Cependant, une compétition demeure entre ces deux souches, avec *T. harzianum* qui épuise les nutriments d'un côté, et *B. velezensis* qui produit des métabolites antifongiques de l'autre.

3.3.3. La mise en place d'une dépendance nutritionnelle, une stratégie permettant de lever la compétition entre *B. velezensis* et *T. harzianum*

La stratégie de coculture développée dans le MN est basée sur la création d'une dépendance nutritionnelle entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437. Ce phénomène a été observé dans le cas de culture *in vitro* de bactéries du sol qui ne poussent qu'en présence d'autres micro ou macroorganismes, suggérant un échange de molécules nécessaires à leur croissance [403].

L'acquisition des nutriments constitue la raison majeure de la mise en place d'une compétition entre les microorganismes. En particulier, dans les milieux de culture où les ressources sont limitées, les microorganismes sont en compétition pour satisfaire leurs besoins nutritifs; le plus efficace réussira à envahir l'autre [404]. Dans les conditions où un microorganisme ne dispose pas d'un élément essentiel à sa croissance et que l'autre peut le lui fournir, la relation pourra évoluer vers un commensalisme [301]. Un mutualisme peut aussi être observé si la dépendance nutritionnelle est bidirectionnelle [303].

Le MN contient uniquement du nitrate comme source d'azote, qui est assimilable par *T. harzianum* mais pas par *B. velezensis*. La coculture de ces deux microorganismes dans le MN permet leur coexistence grâce à la dépendance de la bactérie vis-à-vis du champignon qui lui fournit une source d'azote.

La tendance de la croissance de *B. velezensis* en coculture planctonique montre une amplification au jour 5 de la coculture. Ce résultat concorde avec ceux observés en ajoutant le surnageant de monoculture de *T. harzianum* de différents âges à la monoculture de *B. velezensis*. La croissance de cette dernière est favorisée avec les surnageants prélevés des monocultures fongiques de plus de 5 jours. Le 5^{ème} jour de culture de *T. harzianum* correspond à l'entrée en phase stationnaire (d'après sa courbe de croissance en monoculture et l'épuisement du glucose) et à une phase d'épuisement du glucose. La phase stationnaire de la croissance des microorganismes se caractérise par la production de métabolites non essentiels à leur croissance et à leur développement, appelés métabolites secondaires [405]. Par exemple, un pigment marron de *Trichoderma viride*, le furfural, n'est produit qu'après 6 jours de culture [406]. Le métabolisme secondaire est aussi marqué par la synthèse de nouvelles protéines et l'accumulation d'acides aminés. En effet, l'utilisation du glucose marqué au carbone 13, combinée à l'induction de l'expression de la protéine verte fluorescente, en phase stationnaire de la croissance d'*E. coli* ont révélé la production de nouvelles protéines pendant cette phase. Ces protéines sont synthétisées à partir des acides aminés provenant de la dégradation des protéines produites au cours du métabolisme primaire de la bactérie [407]. Chez *B. subtilis*, des acides aminés ont été

détectés avec des concentrations de l'ordre du millimolaire dans le surnageant de la culture en phase stationnaire [408]. De même, l'entrée de *T. harzianum* en phase stationnaire est accompagnée par la synthèse de nouvelles protéines. Afin de comprendre la nature des molécules produites par *T. harzianum* et impliquées dans la croissance de *B. velezensis*, un bilan massique a été établi en se basant sur les dosages d'azote effectués dans différentes étapes de culture et les matières sèches des microorganismes qui s'y développent (**Figure 56**).

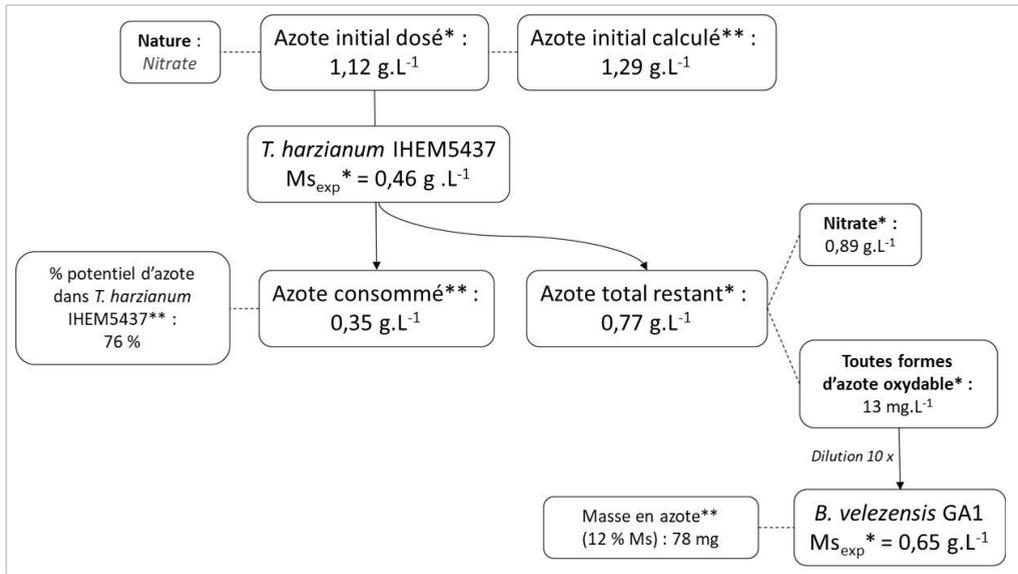


Figure 56 : Bilan massique de *T. harzianum* IHEM5437 et *B. velezensis* GA1 ainsi que les concentrations d'azote avant et après croissance de ces microorganismes. Les valeurs dosées sont signalées par « * » et les valeurs calculées par « ** ». Pour un apport expérimental de 1,12 g.L⁻¹ (apport théorique de 1,29 g.L⁻¹) dosé par le kit HACH, une matière sèche de 0,46 g de *T. harzianum* est pesée après 144 h d'incubation à 30 °C et une concentration résiduelle d'azote de 0,77 g.L⁻¹ est dosée (par le kit HACH). Ceci implique une concentration de 0,35 g.L⁻¹ d'azote consommé par le champignon. La forme dominante d'azote trouvée dans le surnageant de *Trichoderma* est le nitrate (0,89 g.L⁻¹ d'après le dosage par un kit HACH pour les nitrates). Les formes assimilables par *Bacillus* constituent 13 mg.L⁻¹ (dosées par la méthode Kjeldahl) et permettent, après une dilution de 10 fois, la formation de 0,65 g.L⁻¹ de matière sèche de *B. velezensis* (dont 78 mg correspond à l'azote)

Ce bilan massique permet de montrer à première vue une sous-estimation de la concentration d'azote total dosé puisque la valeur dosée avec le kit HACH est inférieure à celle calculée à partir du nitrate de sodium ajouté dans le MN. Après la croissance de *T. harzianum*, une concentration d'azote total de 0,77 g.L⁻¹ est dosée par ce même kit HACH. Par déduction, une concentration de 0,35 g.L⁻¹ d'azote a été consommée par *T. harzianum* pour former 0,46 g de matière sèche dans un litre de culture. Ainsi, un pourcentage potentiel de 76 % constitue la part de la masse d'azote dans la matière sèche du champignon. Cette valeur semble être très élevée puisque

l'azote constitue 2 à 8 % de la matière sèche des champignons [409]. Cette observation peut être expliquée par la sous-estimation de la concentration réelle de l'azote total résiduel dans le surnageant, engendrant ainsi une concentration d'azote consommé plus faible. Toutefois, cette hypothèse ne permettra pas de justifier entièrement la différence observée entre le pourcentage théorique et le pourcentage potentiel d'azote dans la matière sèche de *T. harzianum*. La seconde hypothèse possible est la présence d'une forme d'azote dans le surnageant de *Trichoderma* non dosée par le kit HACH. Une simple précipitation des molécules en question est capable de biaiser les dosages.

D'un autre côté, la part d'azote assimilable par *B. velezensis* dans le surnageant de *T. harzianum* constitue une très faible partie par rapport à l'azote sous forme de nitrate qui y domine (dosages effectués respectivement avec la méthode Kjeldahl et par un kit HACH de dosage du nitrate). Dans une monoculture de *Bacillus* dans le MN avec 10 % de surnageant de *Trichoderma*, un apport de 1,3 mg d'azote assimilable est constaté. Cependant, 60 fois plus de biomasse de *B. velezensis* a été formée par rapport à la biomasse attendue avec cette quantité d'azote. Cette sur-croissance peut être expliquée par deux hypothèses :

- La présence d'une source d'azote supplémentaire qui n'est pas dosée correctement
- L'activation d'une nouvelle voie d'assimilation du nitrate par *B. velezensis*

Bien que la seconde hypothèse expliquerait les résultats du dosage d'azote, la première hypothèse semble être la plus probable en se basant sur la réponse proportionnelle de la croissance de *B. velezensis* à la concentration de surnageant de *T. harzianum* amendé dans le milieu de culture. En effet, la DO_{600nm} est parfaitement corrélée à la quantité de surnageant ajoutée lors des essais de monoculture de *B. velezensis*. En coculture ou en monoculture de *B. velezensis* en présence de 10 % de surnageant de *T. harzianum*, la DO_{600nm} n'a pas dépassé la valeur de 0,5. Cette valeur est multipliée par 13 quand 90 % de surnageant sont amendés dans la monoculture bactérienne, ce qui se rapproche de celle observée en milieu riche. L'augmentation de la quantité de surnageant de *T. harzianum* ajoutée dans la monoculture de *B. velezensis* et par conséquent de l'apport en source d'azote pour le développement de la bactérie induit de plus forts taux de croissance.

Les analyses de MALDI et HPLC-Q/TOF ont mis en évidence la présence de molécules de faible rapport m/z , allant de 227 jusqu'à 861. Ces molécules sont présentes dans la fraction du surnageant de *T. harzianum* renfermant les molécules de masses moléculaires inférieures à 3 kDa, et permettant la croissance de *B. velezensis*. Identifiées comme des fragments de protéines, ces molécules peuvent jouer un rôle dans la croissance de la bactérie. La composition du surnageant en acides aminés, libres ou liés, a été analysée sans pour autant fournir des informations concluantes concernant la nature de ces acides aminés. Des analyses supplémentaires s'avèrent être essentielles dans le but de caractériser les molécules d'intérêt.

3.3.4. Utilisation de la dépendance nutritionnelle pour permettre une coopération entre *B. velezensis* et *T. harzianum* : une approche validée

Quand une source d'azote assimilable par la bactérie (ammonium ou casaminoacides) est ajoutée à la coculture, la dépendance nutritionnelle est levée et un envahissement par la bactérie est observée. Hammarlund *et al.* (2019) a démontré que dans des circonstances similaires à notre étude, quand un échange de nutriment entre les microorganismes cocultivés est requis pour la croissance d'un d'entre eux, l'apport extérieur de ce nutriment à la coculture entraîne la révocation de la dépendance nutritionnelle. Ainsi, si la dépendance révoquée concerne le microorganisme qui a le rythme de croissance le plus rapide, son développement se fera au détriment de celui de l'autre [303]. Ayant tous les éléments nécessaires à sa croissance avec l'ajout de l'ammonium ou des casaminoacides dans le MN, *B. velezensis* GA1 n'est plus dépendante de *T. harzianum* pour avoir une source d'azote et se développe donc au détriment de ce champignon.

En résumé, la croissance de *B. velezensis* GA1 dans le MN est entièrement dépendante de *T. harzianum* IHEM5437. Ce champignon lui fournit la source d'azote essentielle pour sa croissance, en partie sous forme de peptides et d'acides aminés. Cette dépendance nutritionnelle permet à ces deux souches de coexister dans le MN.

L'approche de la dépendance nutritionnelle entre les deux microorganismes étudiés a été également examinée avec d'autres souches de *Bacillus* et de *Trichoderma* pour permettre de valider le modèle pré-établi. Des souches de *B. velezensis* producteurs de lipopeptides antifongiques ont été utilisées ainsi qu'une souche de *B. licheniformis* qui est capable d'assimiler le nitrate comme source d'azote d'après KEGG. Deux différentes espèces de *Trichoderma*, en addition à *T. harzianum* IHEM5437, ont été cocultivées respectivement avec toutes les bactéries citées ci-dessus. Toutes les souches de *B. velezensis*, présentant un déficit en nitrite réductase, sont capables de se développer uniquement en coculture avec les champignons testés (et pas en monoculture). Les microorganismes cocultivés coexistent identiquement à ceux exploités dans cette étude. Cependant, la capacité de *B. licheniformis* à croître indépendamment des souches de *Trichoderma* grâce à sa capacité d'assimiler le nitrate, engendre sa croissance dans le MN en monoculture ainsi qu'en coculture au détriment des champignons. Aucune dépendance nutritionnelle n'a été établie en présence de cette souche et ainsi, sa coexistence avec *Trichoderma* est inconcevable. Ces exemples permettent de montrer que quelque soient les souches de *Bacillus* et de *Trichoderma* utilisées, si la bactérie est incapable d'assimiler la source d'azote disponible dans le milieu de culture, une coexistence entre les deux microorganismes est envisageable.

4. La production de lipopeptides par *B. velezensis* GA1 impactée par le type d'interaction avec *T. harzianum*

En plus de l'effet de la coculture sur la croissance des microorganismes, l'expression de certains gènes et la production de métabolites sont des points à considérer. Ces deux aspects peuvent être affectés par la coculture et ont donc été étudiés. L'expression de certains gènes, cryptiques en monoculture, codant pour des métabolites secondaires intéressants, a pu être détectée en condition de coculture [410]. Par exemple, la production de la gliotine, composé anticancéreux et antibiotique, par le champignon *Aspergillus fumigatus* est possible uniquement en coculture avec une bactérie du genre *Sphingomonas* et pas en monoculture [411]. La compétition entre ces deux microorganismes est nécessaire pour induire cette production.

Dans le cadre de la présente étude, nous nous sommes intéressés à la production de lipopeptides par *B. velezensis* GA1 comme marqueur de l'effet de la coculture avec *T. harzianum*. Comme décrit dans le Chapitre 1, ces métabolites sont intéressants car ils présentent, entre autres, des activités antibactériennes et antifongiques et permettent de stimuler la croissance et les mécanismes de défense chez les plantes.

4.1. Pas d'effet sur la production de lipopeptides en présence d'un amensalisme

Dans le milieu riche, cette production n'est pas affectée par la coculture avec inoculation simultanée ni par l'ajout du surnageant de *T. harzianum*. Dans cette dernière condition, l'activité antifongique et antibactérienne du surnageant de la culture n'est pas compromise par l'ajout de plusieurs concentrations de surnageant fongique. La réduction de la production observée en inoculation séquentielle est attribuée à la faible croissance de la bactérie à cause due au déficit en nutriments. Ainsi, dans ces conditions, la coculture de *B. velezensis* avec *T. harzianum* n'a pas d'effet sur la production des lipopeptides.

D'autres métabolites (et les gènes impliqués dans leur biosynthèse) ont été au centre d'études portant sur l'interaction de différentes souches de *Bacillus* et de *Trichoderma* par le laboratoire du métabolisme microbien à l'université de Shanghai. Chez la bactérie, ils ont notamment suivi l'expression des gènes codant les antibiotiques de type macrolactine et difficidine. Chez *Trichoderma*, l'expression de gènes reliés à la production de spores, la production d'enzymes impliquées dans le mycoparasitisme, la synthèse de NRPSs et PKSs et d'antioxydants en coculture a été étudiée [345]. L'expression de ces gènes est induite par les facteurs environnementaux et peut être révélatrice de la réponse du champignon face à la présence de *Bacillus* [412]. En inoculation séquentielle avec le champignon inoculé en premier, les enzymes hydrolytiques, les antibiotiques et les composés volatils sont surproduits par *Trichoderma* grâce à la compétition avec *Bacillus*. Chez ce dernier, l'expression de la difficidine et la macrolactine s'avère être réduite dans ces mêmes conditions [345].

En inoculation simultanée, le résultat inverse est noté avec une surexpression des gènes de la macrolactine et difficidine chez *Bacillus* et une sous-expression des gènes reliés au métabolisme secondaire de *Trichoderma* [346]. Le microorganisme dont la croissance est favorisée par le mode d'inoculation peut concurrencer le second en renforçant l'expression des gènes intervenant dans son mécanisme d'antagonisme.

Même si ce n'est pas le cas dans ces travaux, l'inoculation séquentielle peut être intéressante pour guider l'expression des gènes d'intérêt et par la suite la production des métabolites correspondants. L'inoculation séquentielle a été utilisée par exemple pour les cocultures des levures du genre *Saccharomyces* et *Torulaspora* afin de modifier leurs profils de production et ainsi de générer de meilleurs vins [413].

4.2. Répression de la production de lipopeptides par *B. velezensis* en coopération avec *T. harzianum*

Dans le MN, la production de LPs par la souche GA1 est suivie en coculture avec *T. harzianum* ainsi qu'en présence de son surnageant ou d'une source assimilable d'azote (sulfate d'ammonium) comme témoin de production dans ce milieu. Une légère production est observée dans cette dernière condition, plus faible que dans le milieu riche. Les iturines, fengycines et surfactines sont moins produites de facteurs de 4, 7 et 3 respectivement. Cette faible production peut être expliquée par la faible densité cellulaire observée dans le MN supplémenté en sulfate d'ammonium par rapport au milieu riche. La phéromone ComX, dépendant de la densité cellulaire et régulant l'expression des promoteurs de NRPSs via le ComA, est produite en plus faibles quantités et induit à des plus faibles niveaux l'expression des synthétases de lipopeptides [134]. La production de ces LPs varie en fonction de la présence du champignon ou uniquement de son surnageant. Dans la première condition, aucun LP n'est détecté dans le surnageant de la coculture. Trois hypothèses ont été émises afin d'expliquer leur absence : (i) ils précipitent avec l'acidification du milieu par le champignon, (ii) ils sont dégradés par le champignon ou (iii) l'expression des gènes codant pour leur synthétase est inhibée. Les lipopeptides précipitent à de faibles pH, d'où l'utilisation de la précipitation acide pour leur purification [414]. Cependant, une précipitation peut être observée à des pH légèrement acide, à un pH égal à 6 pour la surfactine par exemple [415]. Le suivi de l'évolution du pH de la coculture a permis d'écarter cette possibilité puisqu'une alcalinisation, plutôt qu'une acidification, est constatée en coculture. D'un autre côté, bien qu'aucune étude n'ait décrit la dégradation des lipopeptides par les champignons, nous avons examiné cette possibilité en suivant l'évolution de la concentration des 3 lipopeptides en présence d'une grande concentration de surnageant de champignon. L'incubation pendant 24 h de ce surnageant avec les LPs n'a pas engendré leur dégradation. Finalement, la troisième hypothèse a été vérifiée via des analyses de RT-qPCR de l'expression des gènes codants pour les synthétases de l'iturine, la fengycine et la surfactine. L'expression des gènes des synthétases de LPs en coculture dans le MN a été comparée avec celle en monoculture de *B. velezensis* dans le MN supplémenté avec 90 % de surnageant fongique et en milieu riche. Puisque la croissance de la bactérie

dans ces trois conditions n'a pas le même rythme (étendue sur 7 jours en coculture par rapport à 24 à 28 h dans les deux autres conditions), des courbes de croissance ont été établies afin de pouvoir effectuer les analyses dans la même phase de croissance : fin de la phase exponentielle. L'analyse des résultats obtenus montre une répression de l'expression des gènes codant pour les synthétases des 3 LPs en coculture, ce qui explique l'absence de leur production dans le surnageant de la coculture. Entre les deux autres conditions étudiées, aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'expression des gènes codant pour les 3 synthétases. Toutefois, au niveau de la production, deux à trois fois plus de lipopeptides ont été détectés dans le MN en présence du surnageant de *T. harzianum* par rapport au milieu riche TY. Les différents résultats sont repris dans la **Figure 57**.

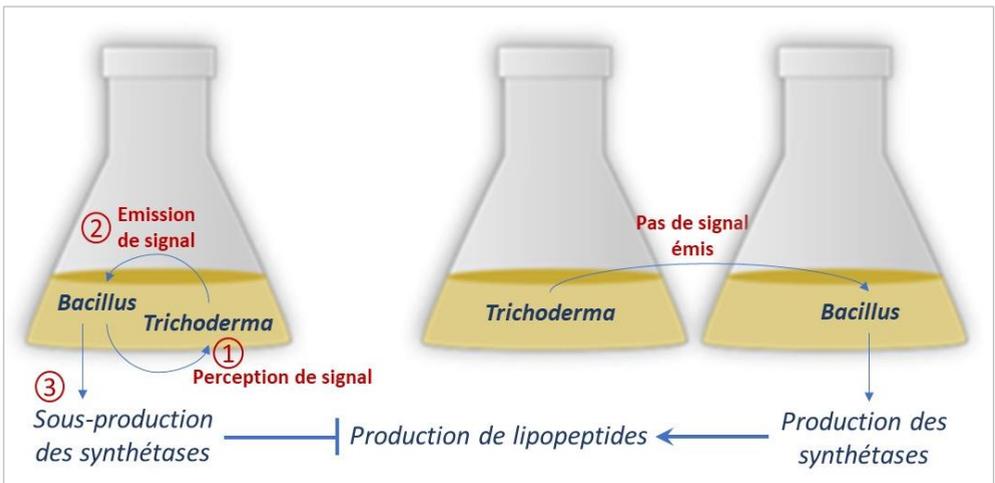


Figure 57 : Le mécanisme d'interaction entre *B. velezensis* et *Trichoderma* en coculture dans le MN ou en monoculture de *B. velezensis* en présence du surnageant de *Trichoderma* dans le MN affectant la production de lipopeptides par la bactérie

Dans un premier temps, la différence du taux de production dans le milieu riche notée entre les différentes expériences a été attribuée au volume de la culture qui est plus important dans la seconde, entraînant une plus grande densité cellulaire et une induction du facteur ComX. Dans un second temps, il est possible que la présence du surnageant de *T. harzianum* stimule la production des lipopeptides en régulant des mécanismes distincts de ceux de l'expression des gènes codant les synthétases des LPs. En effet, la production de lipopeptides dans le MN est remaniée par l'interaction avec le champignon ou avec son sécrétome uniquement. Des exemples dans la littérature ont montré différents profils de production de LPs par des souches de *Bacillus* en présence d'autres microorganismes avec lesquels ils établissent un contact direct ou pas. Par exemple, elle est augmentée en présence de molécules produites par le champignon pathogène *Rhizomucor* et en coculture avec *Pythium* et *Fusarium* mais pas avec *Botrytis* [171]. Dans le cadre de l'interaction entre *B. subtilis* et *Aspergillus niger*, l'expression de l'opéron de la surfactine synthétase ainsi que la production de

ce métabolite sont fortement réduites en coculture [281]. Ceci laisse penser que la régulation de la production de LPs par *Bacillus* est modulée principalement en fonction du genre du champignon avec lequel il interagit [171].

La diminution du taux de molécules à activité antibiotique synthétisées dans le cas d'une coculture favorise la coexistence des microorganismes cocultivés. En effet, des simulations autour des mécanismes de coexistence dans une communauté d'individus produisant des antibiotiques révèlent la nécessité de la présence d'un microorganisme qui les dégrade afin de maintenir la stabilité de la communauté [416]. Dans le cas d'une coculture, l'interaction entre les microorganismes par échange de messagers moléculaires peut engendrer le même effet que la présence d'un partenaire supplémentaire pour dégrader les antibiotiques produits, en altérant les mécanismes de synthèse de ces derniers.

Afin de mettre en évidence l'effet de l'échange de métabolites entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 sur la production de LPs dans cette étude, un système de coculture a été élaboré. Ce système permet la coculture des deux microorganismes avec une séparation physique grâce à une membrane semi-perméable qui garantira uniquement les échanges métaboliques entre eux. Ce système, bien adapté aux cocultures bactériennes, s'avère être inadéquat aux cocultures renfermant un champignon. La capacité des hyphes de *Trichoderma* à se propager sur les bords de l'insert, et à s'incorporer à travers les pores de la membrane et du filtre, empêche le maintien du champignon dans son compartiment. De même, la production de spores, facilement dispersées dans la microplaque, a entraîné des contaminations répétées du compartiment contenant la bactérie. La séparation physique des deux microorganismes demeure ainsi impossible dans ces conditions. En conséquence, ce système de coculture n'a pas permis d'identifier l'implication de l'échange de métabolites entre *B. velezensis* et *T. harzianum* dans la répression de la production de LPs.

Toutefois, un mécanisme impactant la production de métabolites à activité biocide par *Bacillus* en coculture avec *Trichoderma* a été mis en évidence par Karuppiyah *et al.* (2020). Chez *T. atroviride*, la surexpression du gène *Vell* induit l'expression des gènes reliés à la sporulation, au mycoparasitisme et à la production de métabolites secondaires par le champignon [347]. En coculture avec *B. amyloliquefaciens*, l'expression de ce gène est stimulée. Cette surexpression provoque la répression de l'expression des gènes codant pour la macrolactine et la difficidine chez la bactérie. Analogiquement, la présence de *B. velezensis* GA1 en coculture avec *T. harzianum* pourrait induire l'expression du gène *Vell* chez le champignon, qui en retour, réprimerait la production de lipopeptides par la bactérie. Cette hypothèse constitue une piste intéressante qui nécessite d'être étudiée davantage.

Pour conclure, quel que soit le milieu considéré, un élément crucial mis en évidence au cours de cette étude est l'absence d'impact de *T. harzianum* sur la croissance de *B. velezensis*. Au contraire, sa présence est cruciale pour le développement de la bactérie quand elle manque de source d'azote assimilable. Bien que l'interaction soit compétitive dans des conditions où ces deux microorganismes peuvent croître

indépendamment, un commensalisme peut être observé quand la croissance de la bactérie dépend de celle du champignon. Nous pouvons même parler d'un mutualisme si la répression de la production de lipopeptides en coculture est considérée comme un effet avantageux pour *T. harzianum*.

Chapitre 5

Conclusions et Perspectives

1. Conclusions

L'exploitation de nouveaux moyens écologiques de lutte contre les pathogènes des plantes est aujourd'hui une préoccupation constante des industriels et des chercheurs. Ces moyens se focalisent autour de l'emploi de produits d'origine naturelle ou d'êtres vivants qui présentent une bonne efficacité avec moins d'impacts par rapport aux pesticides en termes de toxicité et de rémanence.

Les microorganismes, y compris les bactéries et les champignons, constituent une part non négligeable des agents utilisés dans le biocontrôle. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à des souches de *B. velezensis* et *T. harzianum* qui se développent dans la rhizosphère des plantes. Ces deux microorganismes, bien qu'éloignés en taxonomie, partagent certaines caractéristiques. En effet, ils sont impliqués dans la protection des plantes, que ce soit en leur conférant une résistance contre les pathogènes, en stimulant leur croissance, en activant leurs mécanismes de défense, et/ou en agissant directement sur les pathogènes via différents modes d'action. L'inhibition de la croissance des pathogènes se fait principalement par la production de métabolites secondaires dotés d'activités antimicrobiennes. En particulier, les lipopeptides constituent une classe importante de métabolites synthétisés par *B. velezensis*, associée à leur efficacité dans le biocontrôle.

La diversité de modes d'action employés par *B. velezensis* et *T. harzianum* rend la combinaison de ces microorganismes plus efficace dans le biocontrôle. Bien que des produits combinant des souches de *Bacillus* et de *Trichoderma* existent sur certains marchés européens (hollandais et allemand notamment), aucun produit n'est commercialisé sur les marchés français et belge. L'efficacité des produits à base de ces deux microorganismes d'intérêt encourage au développement d'une nouvelle association permettant d'augmenter possiblement leur potentiel.

La première étape de ce processus consiste en une étude *in vitro* qui permettra de déterminer les modalités d'interaction entre *B. velezensis* et *T. harzianum* et son effet sur leur potentiel biotechnologique, dans l'objectif d'établir les conditions engendrant une efficacité plus importante dans le biocontrôle. Cette étude *in vitro* nécessite le développement d'un système de coculture d'une bactérie et d'un champignon ainsi qu'une série d'analyse pour déterminer leur comportement vis-à-vis de la croissance et de la production de molécules pour le biocontrôle.

Nous avons pu démontrer que l'interaction entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 est variable en fonction des conditions de culture et surtout en fonction de la disponibilité en nutriments. La compétition entre ces microorganismes, remportée par la bactérie productrice de lipopeptides antifongiques et dont la croissance est plus rapide en présence des nutriments vitaux (caractéristique de l'amensalisme), peut être remodelée en mutualisme obligatoire – facultatif quand une dépendance nutritionnelle vis-à-vis du champignon lui est imposée. Ces interactions positives se traduisent par la coexistence des deux microorganismes. Cette coexistence est possible grâce au transfert de source d'azote du champignon vers la bactérie, accompagné d'une répression de la production de lipopeptides antifongiques par cette dernière.

Toutefois, cette production est augmentée en absence de l'interaction physique avec le champignon mais uniquement en présence de son surnageant. Ainsi, nous pouvons conclure qu'un dialogue moléculaire est établi entre *B. velezensis* et *T. harzianum*, gouvernant la régulation de la production des NRPs par la bactérie. Bien qu'une hypothèse soutienne l'intervention du régulateur *Vell* dans ce dialogue, des analyses plus poussées doivent être effectuées afin de déterminer le mécanisme de ces interactions complexes. Les principales hypothèses qui expliquent l'interaction entre *B. velezensis* et *T. harzianum* en présence d'une dépendance nutritionnelle sont résumées dans la **Figure 58**.

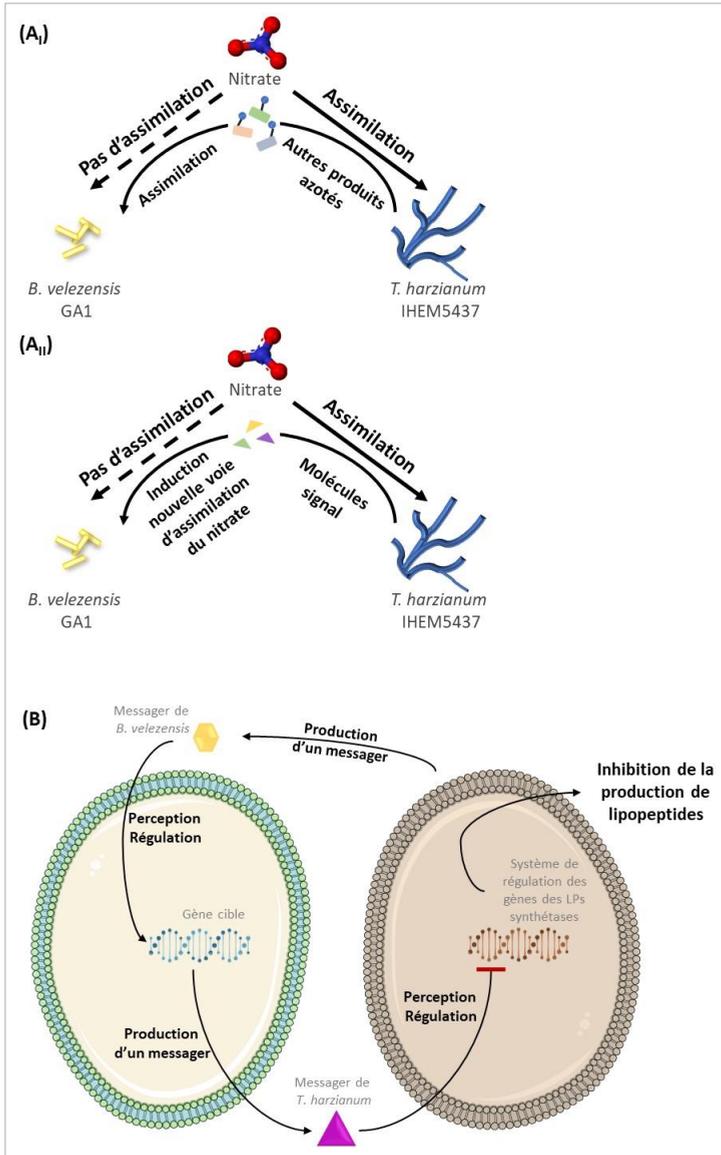


Figure 58 : Résumé des hypothèses expliquant les interactions potentielles entre *B. velezensis* GA1 et *T. harzianum* IHEM5437 en présence d'une dépendance nutritionnelle vis-à-vis de l'azote. En terme de croissance, l'incapacité de *B. velezensis* à assimiler le nitrate est comblée par la production par *T. harzianum* (A_I) d'autres composés azotés assimilables ou (A_{II}) des molécules signal induisant une nouvelle voie d'assimilation du nitrate chez *B. velezensis*. (B) Quant à la production de lipopeptides, un dialogue moléculaire potentiel entre les deux microorganismes (émission d'un signal par *Bacillus*, perception par *Trichoderma* et réponse par l'émission d'un second messenger, inhibition de la synthèse des LPs synthetases à la perception de ce second messenger par *Bacillus*) engendre l'inhibition de la production des lipopeptides antifongiques par la bactérie.

2. Perspectives

Ce projet de thèse a mis en lumière la possibilité de moduler le type d'interaction entre *B. velezensis* et *T. harzianum*, deux agents de biocontrôle fréquemment utilisés, en fonction des disponibilités nutritives. Des perspectives restent à exploiter afin de mieux comprendre les aspects du dialogue moléculaire entre ces microorganismes et en tirer profit pour des applications en agriculture.

2.1. Optimisation des conditions expérimentales

Dans certaines expériences, un support métallique est utilisé pour l'attachement des microorganismes dans l'objectif d'améliorer la croissance et la production de lipopeptides. Cette stratégie a été efficace dans l'augmentation de la biomasse de *T. harzianum* et *B. velezensis* qui se forme attachée sur le support ou en phase planctonique. Néanmoins, la difficulté de la quantification des biomasses dans cette condition a rendu le suivi de la croissance des biomasses respectives de *B. velezensis* et *T. harzianum* attachées au support en coculture inadéquate. Par conséquent, la normalisation de la production de LPs par *B. velezensis* exprimé en unité cellulaire demeure impossible. La méthode de quantification par qPCR est prometteuse pour surmonter cette problématique, mais présente deux défauts : la reproductibilité de l'extraction d'ADN bactérien et la sensibilité de la méthode d'analyse. Une perspective intéressante consisterait à améliorer ou remplacer la méthode utilisée dans le cadre de cette étude pour la rendre opérationnelle. Par exemple, la quantification des biomasses pourrait être effectuée par un comptage de colonies sur boîte. L'utilisation d'antibiotique contre l'un des microorganismes pourrait également permettre le développement respectif de chacun des microorganismes.

2.2. Analyses approfondies du dialogue moléculaire

2.2.1. Criblage de molécules d'intérêt

Dans les travaux présentés, une attention particulière a été portée sur l'effet de l'interaction sur la production de lipopeptides par la bactérie, que ce soit en milieu riche ou en milieu nitrate. La production d'autres métabolites secondaires peut être également suivie dans les conditions préalablement établies. En plus des LPs, *B. velezensis* produit des composés volatiles, des bactériocines comme l'amylolysine, des sidérophores et des antibiotiques. Quant à *Trichoderma*, son implication dans le biocontrôle est liée à la production de composés volatiles, d'enzymes lytiques tels que les cellulases et les chitinases, des sidérophores et des antibiotiques. Une suite plus approfondie de l'étude sur l'interaction entre *B. velezensis* et *T. harzianum* pourrait se reposer sur des analyses transcriptomiques et métabolomiques de l'effet de l'interaction sur l'expression et la production des différents métabolites secondaires liés à l'activité de biocontrôle par les deux espèces interagissantes.

2.2.2. Décryptage de l'interaction bactérie – champignon dans le milieu nitrate

Une approche similaire pourra être adoptée pour identifier les gènes de *T. harzianum* intervenant dans la régulation de la production de lipopeptides par *B. velezensis*. En effet, en plus de l'élargissement du spectre des molécules criblées, le dialogue moléculaire entre *B. velezensis* et *T. harzianum* nécessite d'être décrypté davantage. Sachant que le gène *Vell* peut intervenir dans la régulation de la synthèse de métabolites antifongiques par *Bacillus*, l'utilisation de mutants de *T. harzianum* IHEM5437 n'exprimant pas ou surexprimant ce gène permettra de valider ou pas son rôle dans l'interaction. Une étude bioinformatique et transcriptomique du génome de *T. harzianum* permettra, dans un second temps, de déterminer si d'autres gènes sont impliqués dans la réponse à la présence de la bactérie. Similairement au gène *Vell*, le rôle de ces gènes pourra être élucidé par des cocultures avec des mutants du champignon.

La production, par *T. harzianum*, d'une source d'azote assimilable par *B. velezensis* étant confirmée, la nature de cette source reste à définir. Les différentes analyses effectuées et qui recourent à la technique de l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse ont mis en évidence la présence de peptides variés dans le surnageant du champignon. Le rôle de chacune des molécules identifiées en tant que source d'azote reste à déterminer, par exemple en les ajoutant séparément à la monoculture de *Bacillus* dans le milieu nitrate. Par ailleurs, vu la faible quantité d'azote organique apportée par *T. harzianum*, il serait intéressant de vérifier si cette interaction n'active pas des voies d'assimilation du nitrate chez *Bacillus*, voies différentes des voies actuellement connues.

Afin de confirmer davantage la dépendance nutritionnelle entre *Bacillus* et *Trichoderma*, le clonage du gène de la nitrite réductase chez *B. velezensis* GA1 le rendra capable d'assimiler le nitrate comme unique source d'azote. Le comportement des deux microorganismes interagissant dans le MN serait intéressant à suivre.

2.3. Développement d'applications agricoles

2.3.1. Etude de l'interaction *in planta*

Jusque-là, l'interaction positive entre *Bacillus* et *Trichoderma* avec une dépendance nutritionnelle n'a été observée qu'*in vitro*. Dans le sol, l'interaction avec les autres microorganismes présents ainsi qu'avec la plante peuvent influencer l'interaction entre *Bacillus* et *Trichoderma*. En outre, ces deux microorganismes ne partagent pas les mêmes niches écologiques dans le sol [350]. Cependant, en testant l'effet de la combinaison de *T. asperellum* GDFS1009 et *B. amyloliquefaciens* 1841 contre *Fusarium*, Karuppiyah *et al.* (2019) ont montré que le développement de chaque microorganisme est freiné par l'autre dans le sol. Cent fois moins de *Trichoderma* et de *Bacillus* ont été quantifiés dans la condition où les deux espèces ont été ajoutées ensemble dans le sol, par rapport à la condition où elles ont été inoculées seules [346].

En conséquence, la croissance de *Trichoderma* et de *Bacillus* doit être suivie dans le sol dans des conditions où le nitrate est présent comme source d'azote majeure. Cette perspective permettra de montrer si la présence d'une dépendance nutritionnelle dans le sol conduira à une croissance plus importante des deux microorganismes. Cette meilleure croissance pourrait alors se traduire par une meilleure activité de biocontrôle.

2.3.2. Développement d'un nouveau produit de biocontrôle

Malgré l'inhibition de la croissance de *Trichoderma* par *Bacillus* dans l'étude *in vitro* de Karuppiyah *et al.* (2020), ces deux microorganismes ont permis une meilleure croissance du blé et un meilleur contrôle de *Fusarium in planta* [347]. L'efficacité de la combinaison des souches de *Bacillus* et *Trichoderma* dans la lutte contre les phytopathogènes est plus élevée par rapport à l'application individuelle de ces mêmes espèces. Il serait d'ailleurs avantageux d'étudier l'activité de leur combinaison, en présence d'une dépendance nutritionnelle, dans la stimulation de la croissance de la plante et de l'antagonisme vis-à-vis des pathogènes. Cette perspective requiert la formulation d'un produit composé des deux microorganismes et du nitrate afin de créer cette dépendance. Ainsi, une demande de brevet prioritaire a été déposée à propos de la mise au point de ce nouveau produit. Les deux perspectives concernant l'activité de biocontrôle du produit sont en cours d'exploitation par le biais de collaborations avec des sous-traitants.

Dans un premier temps, le produit sera réalisé sous sa formulation définitive. Le couple champignon/bactérie avec le ratio ayant la plus grande activité antifongique sera encapsulé avec du nitrate sous plusieurs ratios. Ensuite, la stimulation de la croissance du blé et du tabac au niveau de la germination et de la biomasse formée sera étudiée *in vitro* et dans le sol respectivement. Ensuite, la toxicité du produit et son activité antifongique seront évaluées dans plusieurs pathosystèmes :

- *Rhizoctonia solani* dans la laitue, responsable du rhizoctone brun, en serre et en champ
- *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum* et *Eutypa lata* dans la vigne, responsables des maladies du bois, *in vitro* et *in planta*
- *Zymoseptoria tritici* dans le blé, responsable de la septoriose du blé, en serre

Tous ces tests seront également réalisés avec un produit formulé à partir des mêmes microorganismes en absence du nitrate afin de pouvoir déterminer l'implication de la dépendance nutritionnelle sur l'activité final du produit.

Si la nouvelle formulation *T. harzianum* – *B. velezensis* – nitrate prouve une amélioration de l'activité de biocontrôle des microorganismes utilisés, une procédure pour une commercialisation potentielle de cette formulation sera entamée.

Références

1. Mohen, J.-P. (2006) Climat et néolithisation de l'Europe méditerranéenne. *Comptes Rendus Palevol*, **5** (1), 453–462.
2. Silvius, J.E., Ingle, M., and Baer, C.H. (1975) Sulfur dioxide inhibition of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, **56** (3), 434–437.
3. Varshney, C., Garg, J., Lauenroth, W., and Heitschmidt, R. (1979) Plant responses to sulfur dioxide pollution. *C R C Crit. Rev. Environ. Control*, **9** (1), 27–49.
4. Fu, H., Zhao, M., Xu, J., Tan, L., Han, J., Li, D., Wang, M., Xiao, S., Ma, X., and Deng, Z. (2020) Citron C-05 inhibits both the penetration and colonization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* to achieve resistance to citrus canker disease. *Hortic. Res.*, **7** (1).
5. Tekle, S., Dill-Macky, R., Skinnies, H., Tronsmo, A.M., and Bjørnstad, Å. (2012) Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). *Eur. J. Plant Pathol.*, **132** (3), 431–442.
6. Gonzalez, M., Pujol, M., Metraux, J.P., Gonzalez-Garcia, V., Bolton, M.D., and Borrás-Hidalgo, O. (2011) Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Mol. Plant Pathol.*, **12** (3), 209–216.
7. Ambwani, D. (2019) Finding antagonistic bacteria to control *Verticillium dahliae*. *Can. Sci. FAIR J.*, **1** (3), 1–3.
8. Donati, I., Cellini, A., Sangiorgio, D., Vanneste, J.L., Scortichini, M., Balestra, G.M., and Spinelli, F. (2020) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: ecology, infection dynamics and disease epidemiology. *Microb. Ecol.*, **80** (1), 81–102.
9. Aloyce, A., Ndakidemi, P.A., and Mbega, E.R. (2017) Identification and management challenges associated with *Ralstonia solanacearum* (Smith), causal agent of bacterial wilt disease of tomato in sub-Saharan Africa. *Pakistan J. Biol. Sci. PJBS*, **20** (11), 530–542.
10. Prasad, A., Sharma, N., Hari-Gowthem, G., Muthamilarasan, M., and Prasad, M. (2020) Tomato Yellow Leaf Curl Virus: impact, challenges, and management. *Trends Plant Sci.*, **25** (9), 897–911.
11. Muppudathi, S.P., Natarajan, G., Varagur Ganesan, M., Sevugapperumal, N., Subbarayalu, M., John Samuel, K., and Perumal, R. (2020) Role of *Thrips palmi* and *Parthenium hysterophorus* pollen in active spread of tobacco streak virus in the cotton ecosystem. *Virus Res.*, **284** (April), 197979.
12. Oerke, E. (2006) Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.*, **144** (1), 31–43.
13. Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.N., and Hollier, C. (2012) Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Secur.*, **4** (4), 519–537.
14. Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, **484** (7393), 186–194.
15. Van Leeuwen G.C.M., Stein A., Holb I., J.M.. (2000) Yield loss caused by *Monilia fructigena* in Dutch orchards. *Eur. J. Plant Pathol.*, **75**, 534–432.

16. Castella, J.C., Dollon, K., and Savary, S. (2005) Path coefficient analysis to assess yield losses due to a multiple pest complex in cotton in Thailand. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, **25** (1), 39–49.
17. Rakotonindraina, T., Chauvin, J.-É., Pellé, R., Faivre, R., Chatot, C., Savary, S., and Aubertot, J.-N. (2012) Modeling of yield losses caused by potato late blight on eight cultivars with different levels of resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.*, **96** (7), 935–942.
18. Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F.A., Castilla, N.P., and Teng, P.S. (2000) Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to Rice pests in a range of production situations. *Plant Dis.*, **84** (3), 357–369.
19. Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., and Gurr, S.J. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, **360** (6390), 739–742.
20. Rano, S., and Singh, M. (2021) Strategy for the inspection of pesticide residues in food and agriculture, in *Sustainable agriculture reviews 47: pesticide occurrence, analysis and remediation Vol. 1 Biological systems* (eds. Inamuddin, Ahamed, M.I., and Lichtfouse, E.), Springer International Publishing, Cham, pp. 309–333.
21. Bethke, J.A., and Cloyd, R.A. (2009) Pesticide use in ornamental production: what are the benefits? *Pest Manag. Sci.*, **65** (4), 345–350.
22. Hewitt, H. (2014) *Fungicides in crop protection*.
23. Cools, H.J., and Hammond-Kosack, K.E. (2013) Exploitation of genomics in fungicide research: current status and future perspectives. *Mol. Plant Pathol.*, **14** (2), 197–210.
24. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/fungicides-356.html#:~:text=%5B226%20Pages%20Report%5D%20The%20fungicides,USD%2024.5%20billion%20by%202025.>
25. Felsenstein, F., Semar, M., and Stammler, G. (2010) Sensitivität des weizenmehltaus (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) gegenüber metrafenon. *Gesunde Pflanz.*, **62** (1), 29–33.
26. Steinberg, G., and Gurr, S.J. (2020) Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genet. Biol.*, **144**, 103476.
27. Lucas, J.A., Hawkins, N.J., and Fraaije, B.A. (2015) *The Evolution of Fungicide Resistance*, Elsevier Ltd.
28. Green, R., Sang, H., Im, J., and Jung, G. (2018) Chlorothalonil biotransformation by cytochrome P450 monooxygenases in *Sclerotinia homoeocarpa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **365** (19).
29. Ahmed, S., and Ahmad, M. (2006) Effect of insecticides on the total number of soil bacteria under laboratory and field conditions.
30. Ingham, E.R., and Coleman, D.C. (1984) Effects of streptomycin, cycloheximide, Fungizone, captan, carbofuran, cygon, and PCNB on soil microorganisms. *Microb. Ecol.*, **10** (4), 345–358.
31. Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Baatrup-Pedersen, A., Cedergreen, N.,

- McKnight, U.S., Kreuger, J., Jacobsen, D., Kristensen, E.A., and Friberg, N. (2015) The legacy of pesticide pollution: an overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. *Water Res.*, **84**, 25–32.
32. Baćmaga, M., Wyzkowska, J., and Kucharski, J. (2019) The biochemical activity of soil contaminated with fungicides. *J. Environ. Sci. Heal. Part. B, Pestic. food Contam. Agric. wastes*, **54** (4), 252–262.
33. Bhandari, G., Zomer, P., Atreya, K., Mol, H.G.J., Yang, X., and Geissen, V. (2019) Pesticide residues in Nepalese vegetables and potential health risks. *Environ. Res.*, **172** (March), 511–521.
34. Zioga, E., Kelly, R., White, B., and Stout, J.C. (2020) Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. *Environ. Res.*, **189** (July).
35. Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., and Picó, Y. (2017) Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Sci. Total Environ.*, **605–606** (September), 745–754.
36. Ciscato, C.H.P., Gebara, A.B., and Spinosa, H.D.S. (2002) Pesticide residues in cow milk consumed in São Paulo City (Brazil). *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, **37** (4), 323–330.
37. Brasil, V.L.M., Ramos Pinto, M.B., Bonan, R.F., Kowalski, L.P., and da Cruz Perez, D.E. (2018) Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. *J. oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.*, **47** (7), 641–651.
38. Thomashow, L.S. (1996) Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7** (3), 343–347.
39. Robin, D.C., and Marchand, P.A. (2019) Evolution of the biocontrol active substances in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Manag. Sci.*, **75** (4), 950–958.
40. Daura-Pich, O., Hernández, I., Pinyol-Escala, L., Lara, J.M., Martínez-Servat, S., Fernández, C., and López-García, B. (2020) No antibiotic and toxic metabolites produced by the biocontrol agent *Pseudomonas putida* strain B2017. *FEMS Microbiol. Lett.*, **367** (9), 1–9.
41. Sylla, J., Alsanus, B.W., Krüger, E., Reineke, A., Strohmeier, S., and Wohanka, W. (2013) Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology*, **103** (10), 1001–1011.
42. Silvério, F.O., de Alvarenga, E.S., Moreno, S.C., and Picanço, M.C. (2009) Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *Pest Manag. Sci.*, **65** (8), 900–905.
43. Deravel, J., Krier, F., and Jacques, P. (2014) Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **18** (2), 220–232.
44. Ongena, M., and Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, **16** (3), 115–125.
45. Favilla, M., Macchia, L., Gallo, A., and Altomare, C. (2006) Toxicity

- assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem. Toxicol.*, **44** (11), 1922–1931.
46. Celandroni, F., Salvetti, S., Senesi, S., and Ghelardi, E. (2014) *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **361** (2), 95–103.
47. Ipsilantis, I., Samourelis, C., and Karpouzas, D.G. (2012) The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, **45**, 147–155.
48. Gerhardson, B. (2002) Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.*, **20** (8), 338–343.
49. Freeman (2008) An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Heal. Instr.*
50. Henry Guillaume, Thonart Philippe, O.M. (2012) PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.*, **16** (257–268).
51. Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.M., and Pugin, A. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **16** (12), 1118–1128.
52. Jamiółkowska, A. (2020) Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, **10** (2).
53. Angelini, P., Pagiotti, R., Menghini, A., and Vianello, B. (2006) Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. *Ann. Microbiol.*, **56** (1), 65–69.
54. Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Valè, G., Tacconi, G., and Malnati, M. (2007) In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Let. Appl. Microbiol.*, **44** (6), 613–618.
55. Yu, D., Wang, J., Shao, X., Xu, F., and Wang, H. (2015) Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microbiol.*, **119** (5), 1253–1262.
56. Pavela, R., and Benelli, G. (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci.*, **21** (12), 1000–1007.
57. Shazia Parveen, Abdul Hamid Wani, Athar Ali Ganie, Shaukat Ahmad Pala, R.A.M. (2014) Antifungal activity of some extract against some plant pathogenic fungi. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, **47**, 279–284.
58. Pastucha, A. (2008) Chitosan as compound inhibiting the occurrence of soybean diseases. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, **7** (3), 41–55.
59. Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., and Slusarenko, A.J. (2004) Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **65** (2), 79–89.

60. Pięta, D., Patkowska, E., and Pastucha, A. (2005) The protective effect of biopreparations applied as the dressing for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, **4** (2), 59–67.
61. Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, **34** (6), 1037–1062.
62. Asaka, O., and Shoda, M. (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-Off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (11), 4081–4085.
63. Mizumoto, S., Hirai, M., and Shoda, M. (2007) Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75** (6), 1267–1274.
64. Li, J., Zou, C., Xu, J., Ji, X., Niu, X., Yang, J., Huang, X., and Zhang, K.Q. (2015) Molecular mechanisms of nematode–nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **53**, 67–95.
65. Chen, P.H., Chen, R.Y., and Chou, J.Y. (2018) Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, **46** (1), 33–46.
66. Kumar, V., and Chandel, S. (2016) Mycoviruses and their role in biological control of plant diseases. *Int. J. Plant Sci.*, **11** (2), 375–382.
67. Álvarez, B., López, M.M., and Biosca, E.G. (2019) Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne lytic bacteriophages. *Front. Microbiol.*, **10**, 2813.
68. Lugtenberg, B.J.J., and Bloemberg, G. V (2004) *Pseudomonas*, Volume 1: Genomics, life style and molecular architecture, in *Life in the rhizosphere* (eds.Ramos, J.-L.), Springer US, Boston, MA, pp. 403–430.
69. Badri, D. V., and Vivanco, J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environ.*, **32** (6), 666–681.
70. Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., and Moënnelocoz, Y. (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, **321** (1–2), 341–361.
71. Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, P.A.H.M. (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*, **17** (8), 478–486.
72. Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*, **2012**, 963401.
73. Fritze, D. (2004) Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, **94** (11), 1245–1248.
74. Goto, K., Omura, T., Hara, Y., and Sadaie, Y. (2000) Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **46** (1), 1–8.
75. Radhakrishnan, R., Hashem, A., and Allah, E.F.A. (2017) *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in

- adverse environments. **8** (September), 1–14.
76. Daniel R. Zeigler and John B. Perkins (2015) The genus *Bacillus*, in *Practical Handbook of Microbiology*, pp. 38.
77. Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., and Quesada, E. (2005) *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55** (1), 191–195.
78. Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Piel, J., and Borriss, R. (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.*, **140** (1–2), 27–37.
79. Kolter, R. (2010) Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology. *Int. Microbiol.*, **13** (1), 1–7.
80. Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N., and Mahadik, K.R. (2009) Biofilm: importance and applications. *Indian J. Biotechnol.*, **8** (2), 159–168.
81. Kröber, M., Verwaaijen, B., Wibberg, D., Winkler, A., Pühler, A., and Schlüter, A. (2016) Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. *J. Biotechnol.*, **231**, 212–223.
82. Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, **14** (9), 563–575.
83. Al-Ali, A., Dravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., and Jacques, P. (2018) Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25** (30), 29910–29920.
84. Fan, B., Chen, X.H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., and Borriss, R. (2011) Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *J. Biotechnol.*, **151** (4), 303–311.
85. Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., Denham, E.L., Fogg, M.J., Fromion, V., Goelzer, A., Hansen, A., Härtig, E., Harwood, C.R., Homuth, G., Jarmer, H., Jules, M., Klipp, E., Le Chat, L., Lecointe, F., Lewis, P., Liebermeister, W., March, A., Mars, R.A.T., Nannapaneni, P., Noone, D., Pohl, S., Rinn, B., Rügheimer, F., Sappa, P.K., Samson, F., Schaffer, M., Schwikowski, B., Steil, L., Stülke, J., Wiegert, T., Devine, K.M., Wilkinson, A.J., van Dijl, J.M., Hecker, M., Völker, U., Bessières, P., and Noirot, P. (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, **335** (6072), 1103–1106.
86. Raza, W., Ling, N., Yang, L., Huang, Q., and Shen, Q. (2016) Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic

- compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Sci. Rep.*, **6** (1), 1–13.
87. Luo, W., Liu, L., Qi, G., Yang, F., Shi, X., and Zhao, X. (2019) Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in Microcapsules for biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. **85** (9), 1–13.
 88. Romanazzi, G., and Feliziani, E. (2014) *Botrytis cinerea* (Gray Mold). *Postharvest Decay Control Strateg.*, (December 2014), 131–146.
 89. Zhu, M., He, Y., Li, Y., Ren, T., Liu, H., Huang, J., Jiang, D., Hsiang, T., and Zheng, L. (2020) Two new biocontrol agents against clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Front. Microbiol.*, **10** (January), 1–18.
 90. Rabbee, M.F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C., and Baek, K. hyun (2019) *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, **24** (6), 1–13.
 91. Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., and Garbeva, P. (2017) Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Front. Microbiol.*, **8**, 2484.
 92. Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., and Zhang, Y. (2017) Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control*, **105**, 27–39.
 93. Lim, S.M., Yoon, M.-Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S., Park, H.W., Yu, N.H., Kim, Y.H., and Kim, J.-C. (2017) Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *plant Pathol. J.*, **33** (5), 488–498.
 94. Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A.P., Blanco, D., and Venturini, M.E. (2020) Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biol. Technol.*, **166**, 111208.
 95. Lagos, R. (2013) Bacteriocins, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (eds. Maloy, S., and Hughes, K.B.T.), Academic Press, San Diego, pp. 277–279.
 96. Scholz, R., Molohon, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Süßmuth, R.D., Mitchell, D.A., and Borriss, R. (2011) Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.*, **193** (1), 215–224.
 97. Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K., Schwecke, T., Herfort, S., Lasch, P., and Borriss, R. (2014) Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.*, **196** (10), 1842–1852.
 98. Arguelles Arias, A., Ongena, M., Devreese, B., Terrak, M., Joris, B., and Fickers, P. (2013) Characterization of amylolysin, a novel lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *PLoS One*, **8** (12), e83037.
 99. Arguelles Arias, A., Joris, B., and Fickers, P. (2014) Dual mode of action of

- amyloylase: a type-B lantibiotic produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *Protein Pept. Lett.*, **21** (4), 336–340.
100. Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., and Roskoski, R. (1971) Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **35**, 1–34.
 101. Caboche, S., Leclère, V., Pupin, M., Kucherov, G., and Jacques, P. (2010) Diversity of monomers in nonribosomal peptides: Towards the prediction of origin and biological activity. *J. Bacteriol.*, **192** (19), 5143–5150.
 102. Lim, Y.P., Go, M.K., and Yew, W.S. (2016) Exploiting the biosynthetic potential of type III polyketide synthases. *Molecules*, **21** (6).
 103. Challis, G.L., and Naismith, J.H. (2004) Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14** (6), 748–756.
 104. Weber, T., and Marahiel, M.A. (2001) Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, **9** (1), 3–9.
 105. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **6** (8), 493–505.
 106. Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., and Burkart, M.D. (2014) The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat. Prod. Rep.*, **31** (1), 61–108.
 107. Stachelhaus, T., Hüser, A., and Marahiel, M.A. (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **3** (11), 913–21.
 108. Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A., and Holak, T.A. (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure*, **8** (4), 407–18.
 109. Zhang, J., Liu, N., Cacho, R.A., Gong, Z., Liu, Z., Qin, W., Tang, C., Tang, Y., and Zhou, J. (2016) Structural basis of nonribosomal peptide macrocyclization in fungi. *Nat. Chem. Biol.*, **12** (12), 1001–1003.
 110. Belshaw, P.J., Walsh, C.T., and Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* (80-).
 111. Kohli, R.M., Takagi, J., and Walsh, C.T. (2002) The thioesterase domain from a nonribosomal peptide synthetase as a cyclization catalyst for integrin binding peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99** (3), 1247–1252.
 112. Tseng, C., Bruner, S., Kohli, R., Marahiel, M., Walsh, C., and Sieber, S. (2002) Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*, **41** (45), 13350–13359.
 113. Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., and Walsh, C.T. (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **40** (24), 7099–7108.
 114. Vassaux, A. (2019) Mécanisme de biosynthèse et production de l'astine, un

- pentapeptide cyclique non-ribosomique de *Cyanodermella asteris*.
115. Samel, S.A., Czodrowski, P., and Essen, L.-O. (2014) Structure of the epimerization domain of tyrocidine synthetase A. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **70** (Pt 5), 1442–52.
 116. Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A., and Patel, H.M. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5** (5), 525–534.
 117. Reimer, J.M., Aloise, M.N., Harrison, P.M., and Martin Schmeing, T. (2016) Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase. *Nature*, **529** (7585), 239–242.
 118. Du, L., Chen, M., Sánchez, C., and Shen, B. (2000) An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189** (2), 171–175.
 119. Cai, W., and Zhang, W. (2018) Engineering modular polyketide synthases for production of biofuels and industrial chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **50**, 32–38.
 120. Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., and Fickers, P. (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.*, **8**, 1–12.
 121. Salazar, F., Ortiz, A., and Sansinenea, E. (2020) A strong antifungal activity of 7-O-succinyl macrolactin A vs macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. *Curr. Microbiol.*, **77** (11), 3409–3413.
 122. Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., and Gao, X. (2015) Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci. Rep.*, **5** (March), 1–9.
 123. Patel, P.S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P., and Mayerl, F. (1995) Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **48** (9), 997–1003.
 124. Rapp, C., Jung, G., Katzer, W., and Loeffler, W. (1988) Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an antifungal dipeptide with an unusual chlorine-containing amino acid. *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **27** (12), 1733–1734.
 125. Wu, L., Wu, H., Chen, L., Xie, S., Zang, H., Borriss, R., and Gao, X. (2014) Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80** (24), 7512 LP – 7520.
 126. Dertz, E.A., Xu, J., Stintzi, A., and Raymond, K.N. (2006) Bacillibactin-

- mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (1), 22–23.
127. Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., and Borriss, R. (2007) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.*, **25** (9), 1007–1014.
 128. Cochrane, S.A., and Vederas, J.C. (2014) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev*, (1), 4–31.
 129. Hu, F., Liu, Y., and Li, S. (2019) Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microb. Cell Fact.*, **18** (1), 42.
 130. Hahn, M., and Stachelhaus, T. (2004) Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101** (44), 15585–15590.
 131. Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., and Walsh, C.T. (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Society*, **37** (January), 1585–1595.
 132. Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51** (5), 553–563.
 133. Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., and Ongena, M. (2011) The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cell. Microbiol.*, **13** (11), 1824–1837.
 134. Zhi, Y., Wu, Q., and Xu, Y. (2017) Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Sci. Rep.*, **7** (1), 40976.
 135. Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Dommes, J., and Ongena, M. (2014) Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact*, **27** (2), 87–100.
 136. Durrant, W.E., and Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42** (1), 185–209.
 137. Fobert, P.R., and Després, C. (2005) Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8** (4), 378–382.
 138. Apel, K., and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373–399.
 139. Fedoroff, N. (2006) Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Ann. Bot.*, **98** (2), 289–300.
 140. Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P., and Ongena, M. (2009) Insights into the defense-related events occurring in

- plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **22** (4), 456–468.
141. Baysal, T., and Demirdöven, A. (2007) Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Technol.*, **40** (4), 491–496.
 142. Viswanath, K.K., Varakumar, P., Pamuru, R.R., Basha, S.J., Mehta, S., and Rao, A.D. (2020) Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *J. Plant Biol.*, **63** (2), 83–95.
 143. Dixon, R.A., Achmine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M.S.S., and Wang, L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.*, **3** (5), 371–390.
 144. Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., and Dong, X. (2000) Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12** (11), 2175–2190.
 145. Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Després, C. (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.*, **1** (6), 639–647.
 146. Rahman, A., Uddin, W., and Wenner, N.G. (2015) Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Mol. Plant Pathol.*, **16** (6), 546–558.
 147. Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M.N., Gaucher, M., Deleu, M., and Jijakli, M.H. (2018) Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent defense responses. *Agric.*, **8** (1).
 148. Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., and Ptak, M. (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, **74** (12), 1047–1051.
 149. Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., and Wang, Q. (2017) Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Front. Microbiol.*, **8**, 1973.
 150. Bais, H.P., Fall, R., and Vivanco, J.M. (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.*, **134** (1), 307–319.
 151. Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., and Thonart, P. (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69** (1), 29–38.
 152. Wu, C., Chen, C., Lee, Y., Cheng, Y., Wu, Y., Shu, H., Go, F., and Liu, S. (2007) Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. *J Biol Chem*, **282** (8), 5608–5616.
 153. Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., and Thonart, P. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ.*

- Microbiol.*, **9** (4), 1084–1090.
154. Farzand, A., Moosa, A., Zubair, M., Khan, A.R., Massawe, V.C., Tahir, H.A., Sheikh, T.M., Ayaz, M., and Gao, X. (2019) Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by the induction of systemic resistance and regulation of antioxidant pathways in tomato using fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Biomolecules*, **9** (10).
 155. Hoffmann, L. (2003) Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate / quinate. *Cell. Biol.*, 1–168.
 156. Deleu, M., Paquot, M., and Nylander, T. (2005) Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.*, **283** (2), 358–365.
 157. Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., and Teixidó, N. (2012) Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. J. Plant Pathol.*, **132** (4), 609–619.
 158. Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., and Li, Y. (2017) Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiol. Res.*, **199**, 89–97.
 159. Tsuge, K., Inoue, S., Ano, T., Itaya, M., and Shoda, M. (2005) Horizontal transfer of iturin A operon to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49** (11), 4641–4648.
 160. Guillen, N., Weinrauch, Y., and Dubnau, D.A. (1989) Cloning and characterization of the regulatory *Bacillus subtilis* competence genes *comA* and *comB*. *J. Bacteriol.*, **171** (10), 5354–5361.
 161. Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., and Suzuki, S. (2015) Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460** (4), 1015–1020.
 162. Yamamoto, S., Shiraishi, S., and Suzuki, S. (2015) Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **60** (4), 379–386.
 163. Park KyungSeok; Cho YungEun; Balaraju, K.; L.S.; P.J.; M.S. (2013) Induction of systemic resistance against *Phytophthora capsici* and *Pectobacterium carotovorum* SCC1 by treatment of iturin derivatives in chili-pepper. *3rd Asian Conf. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria other Microbials, Manila, Philipp.*, 342–349.
 164. Maget-Dana, R., and Peypoux, F. (1994) Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, **87** (1), 151–174.

165. Ye, Y., Li, Q., Fu, G., Yuan, G., Miao, J., and Lin, W. (2012) Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight. *J. Integr. Agric.*, **11** (1), 90–99.
166. Han, Q., Wu, F., Wang, X., Qi, H., Shi, L., Ren, A., Liu, Q., Zhao, M., and Tang, C. (2015) The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Environ. Microbiol.*, **17** (4), 1166–1188.
167. Latoud, C., Peypoux, F., and Michel, G. (1987) Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modifications of membrane permeability and lipid composition. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **40** (11), 1588–1595.
168. Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.-S., Wathélet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (8), 4577–4584.
169. Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., and Pérez-García, A. (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **20** (4), 430–440.
170. Kang, B.R., Park, J.S., and Jung, W.-J. (2020) Antifungal evaluation of fengycin isoforms isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* PPL against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Microb. Pathog.*, **149**, 104509.
171. Zihalirwa Kulimushi, P., Argüelles Arias, A., Franzil, L., Steels, S., and Ongena, M. (2017) Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.*, **8**, 850.
172. Myo, E.M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., and Ge, B. (2019) Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biol. Control*, **134**, 23–31.
173. Bashan, Y., and De-Bashan, L.E. (2010) Chapter Two - How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment, in *Advances in Agronomy*, vol. 108, Academic Press, pp. 77–136.
174. Singh HB (2017) *Advances in PGPR research*.
175. Robinson, D. (2001) Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants in patchy soil. *Plant Soil*, **232** (1), 41–50.
176. Fernández Bidondo, L., Bompadre, J., Pergola, M., Silvani, V., Colombo, R., Bracamonte, F., and Godeas, A. (2012) Differential interaction between two *Glomus intraradices* strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize

- rhizosphere. *Pedobiologia (Jena)*, **55** (4), 227–232.
177. Theodorou, M.E., and Plaxton, W.C. (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.*, **101** (2), 339–344.
178. Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Lee, K.-E., You, Y.-H., Ko, J.-H., Kim, J.-H., and Lee, I.-J. (2015) Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.*, **65** (7), 637–647.
179. Radhakrishnan, S.K.R., Lee, Y.Y.G.J.I., and Kim, K.L.J. (2014) Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. **54** (4), 427–433.
180. Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.*, **60** (4), 579–598.
181. Kuan, K.B., Othman, R., and Rahim, K.A. (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS One*, 1–19.
182. Rout, G.R., and Sahoo, S. (2015) Role of iron in plant growth and metabolism. *Rev. Agric. Sci.*, 1–24.
183. Boomsma, C.R., and Vyn, T.J. (2008) Maize drought tolerance: potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *F. Crop. Res.*, **108** (1), 14–31.
184. Zgallai, H., Steppe, K., and Lemeur, R. (2005) Photosynthetic, physiological and biochemical responses of tomato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. *J. Integr. Plant Biol.*, **47** (12), 1470–1478.
185. Hu, N., Zheng, J., Ding, D., Liu, J., Yang, L.-Q., Yin, J., Li, G.-Y., Wang, Y.-D., and Liu, Y.-L. (2009) Metal pollution in huayuan river in hunan province in China by manganese sulphate waste residue. *Bull. Env. Contam. Toxicol.*, **83** (4), 583–590.
186. Ashraf, M.A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M., and Arif, M.S. (2017) Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: A review. *J. Environ. Manage.*, **198**, 132–143.
187. Bosecker, K. (1997) Bioremediation: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **20** (3–4), 591–604.
188. Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., You, Y.-H., Khan, A.-L., Lee, K.-E., Lee, J.-D., and Lee, I.-J. (2015) Enterobacter asburiae KE17 association regulates physiological changes and mitigates the toxic effects of heavy metals in soybean. *Plant Biol.*, **17** (5), 1013–1022.
189. Bottini, R., Cassán, F., and Piccoli, P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase.

- Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65** (5), 497–503.
190. Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. V, and Gao, X. (2017) Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front. Microbiol.*, **8**, 171.
 191. Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E. V, and Kudoyarova, G.R. (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*, **272** (1), 201–209.
 192. Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S., and Shen, L. (2014) Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **30** (3), 835–845.
 193. Pourbabaee, A.A., Bahmani, E., Alikhani, H.A., and Emami, S. (2016) Promotion of wheat growth under salt stress by halotolerant bacteria containing ACC deaminase. *J. Agric. Sci. Technol.*, **18**, 855–864.
 194. Dubois, M., Van den Broeck, L., and Inzé, D. (2018) The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends Plant Sci.*, **23** (4), 311–323.
 195. Esposito, E., and Silva, M. da (1998) Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, **24** (2), 89–98.
 196. Howell, C.R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, **87** (1), 4–10.
 197. Yedidia, I.I., Benhamou, N., and Chet, I.I. (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** (3), 1061–1070.
 198. Weindling, R. (1934) Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctinia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, **24**, 1153–1179.
 199. Elad, Y. (2000) Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot.*, **19** (8), 709–714.
 200. Abdusamatov, S., Alimov, J., Shurigin, V., and Davranov, K. (2020) *Trichoderma harzianum* 857 is an effective destructor of cellulose-containing raw materials. *Environ. Sci. An Indian J. Res.*, **16** (June).
 201. Casabar, J.T., Ramaraj, R., Tipnee, S., and Unpaprom, Y. (2020) Enhancement of hydrolysis with *Trichoderma harzianum* for bioethanol production of sonicated pineapple fruit peel. *Fuel*, **279**, 118437.
 202. Blaya, J., López-Mondéjar, R., Lloret, E., Pascual, J.A., and Ros, M. (2013) Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling *Fusarium* wilt. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **107** (1), 112–119.
 203. Hirpara, D.G., Gajera, H.P., Hirapara, J.G., and Golakiya, B.A. (2017) Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant

- Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Infect. Genet. Evol.*, **55** (May), 75–92.
204. Úrbez-Torres, J.R., Tomaselli, E., Pollard-Flamand, J., Boulé, J., Gerin, D., and Pollastro, S. (2020) Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathol. Mediterr.*, **59** (3), 425–439.
205. Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A., and Hossain, K. (2014) *Trichoderma* spp.: A biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pakistan J. Bot.*, **46** (4), 1489–1493.
206. Barak, R., Elad, Y., Mirelman, D., and Chet, I. (1985) Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **75**, 458–462.
207. Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y., and Stewart, A. (2003) Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.*, **31** (4), 281–291.
208. Hasan, S., Gupta, G., Anand, S., and Kaur, H. (2014) Lytic enzymes of *Trichoderma*: their role in plant defense. *Int. J. Appl. Res. Stud.*, **3** (2), 1–5.
209. Yassin, M.T., Mostafa, A.A.-F., Al-Askar, A.A., Sayed, S.R.M., and Rady, A.M. (2021) Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, *in vitro*. *J. King Saud Univ. - Sci.*, **33** (3), 101363.
210. Mustafa, G., Anwar, S., Joyia, F.A., Hayat, M.B., Zia, M.A., Ghazala, and Khan, M.S. (2020) Molecular characterization and mycoparasitic aptitude of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *J. Anim. Plant Sci.*, **30** (6), 1508–1515.
211. Haran, S., Schickler, H., and Chet, I. (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, **142** (9), 2321–2331.
212. Sivan, A., and Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, **135** (3), 675–682.
213. Ajith, P.S., and Lakshmidhevi, N. (2010) Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell peppers. *Nat. Sci.*, **8** (November), 265–269.
214. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., and Lorito, M. (2008) *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.*, **40** (1), 1–10.
215. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., and Lorito, M. (2014) *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.*, **8** (1), 127–139.
216. Patra Dipankar, Dureja P, S.K.K. (2003) Secondary metabolites from mycelia extract of *Trichoderma harzianum*. *Pestic. Res. J.*, **15** (2), 151–154.
217. Scarselletti, R., and Faull, J.L. (1994) *In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a

- metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycol. Res.*, **98** (10), 1207–1209.
218. El-Hasan, A., Walker, F., and Buchenauer, H. (2008) *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Phytopathol.*, **156** (2), 79–87.
219. Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B., and Claydon, N. (1989) Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (11), 1885–1887.
220. andey Manisha, Ahmad Shafaat, John Suchit A., K.K.Z. (2019) Antifungal potential of native *Trichoderma* isolates against *Pythium aphanidermatum* causing Chilli damping-off. *Ann. Plant Prot. Sci.*, **27** (102–106).
221. Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., and Lorito, M. (2009) Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, **48** (6), 705–711.
222. Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B.W., and Ghisalberti, E.L. (2009) Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.*, **72** (11), 2032–2035.
223. Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., and Sivasithamparam, K. (2006) Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, **43** (2), 143–148.
224. Claydon, N., Hanson, J.R., Truneh, A., and Avent, A.G. (1991) Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*, **30** (11), 3802–3803.
225. Daniel, J.F. de S., and Filho, E.R. (2007) Peptaibols of *Trichoderma*. *Nat. Prod. Rep.*, **24** (5), 1128–1141.
226. Almassi, F., Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., and Sivasithamparam, K. (1991) New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.*, **54** (2), 396–402.
227. Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., and Kubicek, C.P. (1996) Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.*, **178** (21), 6382–6385.
228. Duval, D., Riddell, F.G., Rebuffat, S., Platzer, N., and Bodo, B. (1998) Ionophoric activity of the antibiotic peptaibol trichorzin PA VI: a ²³Na- and ³⁵Cl-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1372** (2), 370–378.
229. el Hajji, M., Rebuffat, S., Lecommandeur, D., and Bodo, B. (1987) Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **29** (2), 207–215.
230. Aloj, V., Vinale, F., Woo, S., Marra, R., Ruocco, M., Ritieni, A., Campanile, G., Scala, F., Cavallo, P., and Lorito, M. (2009) Use of a *Trichoderma* spp. enzyme mixture to increase feed digestibility and degrade mycotoxins. *J.*

- PLANT Pathol.*, **91** (4), 45–96.
231. Elad, Y., and Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **105** (2), 177–189.
 232. Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., and Codón, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol. Off. J. Spanish Soc. Microbiol.*, **7** (4), 249–260.
 233. Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S.L., and Lorito, M. (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **347** (2), 123–129.
 234. Palmieri, M.C., Perazzolli, M., Matafora, V., Moretto, M., Bachi, A., and Pertot, I. (2012) Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. *J. Exp. Bot.*, **63** (17), 6237–6251.
 235. Singh, B.N., Singh, A., Singh, S.P., and Singh, H.B. (2011) *Trichoderma harzianum* - mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **131** (1), 121–134.
 236. Mastouri, F., Björkman, T., and Harman, G.E. (2012) *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **25** (9), 1264–1271.
 237. Gallou, A., Cranenbrouck, S., and Declerck, S. (2009) *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **124** (2), 219–230.
 238. Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E., and Pertot, I. (2011) *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol. Control*, **58** (1), 74–82.
 239. Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., and Chen, W. (2013) Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiol. Biochem. PPB*, **73**, 106–113.
 240. Naher, L., Ho, C.-L., Tan, S.G., Yusuf, U.K., and Abdullah, F. (2011) Cloning of transcripts encoding chitinases from *Elaeis guineensis* Jacq. and their expression profiles in response to fungal infections. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **76** (2), 96–103.
 241. Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. (2000) Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.*, **38** (11), 863–873.
 242. Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., and Chet, I. (2010) Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.*, **305** (1), 42–48.
 243. Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J.A., and Van Wees,

- S.C.M. (2014) Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *J. Chem. Ecol.*, **40** (7), 804–815.
244. Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., and Bennett, J.W. (2016) Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol. Biotechnol.*, **3** (1), 7.
245. Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., and Chen, J. (2004) Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, **94** (2), 147–153.
246. Shores, M., and Harman, G.E. (2008) The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiol.*, **147** (4), 2147–2163.
247. El-Hasan, A., and Buchenauer, H. (2009) Actions of 6-Pentyl-alpha-pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defence responses in maize. *J. Phytopathol.*, **157** (11-12), 697–707.
248. Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., and Chet, I. (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*, **235** (2), 235–242.
249. Meyer, S.L.F., and Roberts, D.P. (2002) Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *J. Nematol.*, **34** (1), 1–8.
250. Alamri S, Hashem M, M.Y. (2012) *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-born phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *biocontrol Sci.*, **17** (4), 155–167.
251. Santhanam, R., Luu, V.T., Weinhold, A., Goldberg, J., Oh, Y., and Baldwin, I.T. (2015) Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112** (36), E5013-20.
252. Khan, T.A., Khan S.T., Fazal M., and S.Z.A. (1997) Biological control of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani* disease complex in papaya using *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Nematol.*, **7**, 127–132.
253. De Vrieze, M., Germanier, F., Vuille, N., and Weisskopf, L. (2018) Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Front. Microbiol.*, **9**, 2573.
254. Van Wijk W.R (1965) Soil microclimate, its creation, observation and modification, in *Agricultural Meteorology. Meteorological Monographs*, pp. 6.
255. Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinoor, A. (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, **91** (7), 621–627.
256. Anand, T., Chandrasekaran, A., Kuttalam, S., Senthilraja, G., and Samiyappan,

- R. (2010) Integrated control of fruit rot and powdery mildew of chilli using the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* and a chemical fungicide. *Biol. Control*, **52** (1), 1–7.
257. Di Francesco, A., and Mari, M. (2014) Use of biocontrol agents in combination with physical and chemical treatments: efficacy assessment. *Stewart Postharvest Rev.*, **10** (1).
258. Janisiewicz, W. (1996) Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology*, **86** (5), 473–479.
259. Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., and Mugnai, L. (2017) Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Prot.*, **97**, 85–93.
260. Xu, X.M., Jeffries, P., Pautasso, M., and Jeger, M.J. (2011) Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, **101** (9), 1024–1031.
261. Robinson-Boyer, L., Jeger, M.J., Xu, X.-M., and Jeffries, P. (2009) Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Sci. Technol.*, **19** (10), 1051–1065.
262. Abeysinghe, S. (2009) Effect of combined use of *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01 on biological control of *Rhizoctonia solani* on *Solanum melongena* and *Capsicum annuum*. *Plant Pathol. J.*, **8** (1), 9–16.
263. Hwang, J., and Benson, D.M. (2002) Biocontrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*. *Plant Dis.*, **86** (1), 47–53.
264. Maketon, M., Apisitsantikul, J., and Siriraweeikul, C. (2008) Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Brazilian J. Microbiol.*, **39** (2), 296–300.
265. Yobo, K.S., Laing, M.D., and Hunter, C.H. (2011) Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. *African J. Biotechnol.*, **10** (44), 8746–8756.
266. Yobo, K.S. (2005) Biological control and plant growth promotion by selected *Trichoderma* and *Bacillus* species.
267. Zaim, S., Bekkar, A.A., and Belabid, L. (2018) Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, **51** (3–4), 217–226.
268. Curtis, T.P., Sloan, W.T., and Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99** (16), 10494–10499.
269. Abisado, R.G., Benomar, S., Klaus, J.R., Dandekar, A.A., and Chandler, J.R. (2018) Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *MBio*, **9** (3), 1–13.

270. Grosskopf, T., and Soyer, O.S. (2014) Synthetic microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol.*, **18** (100), 72–77.
271. Shaw, G.T.-W., Pao, Y.-Y., and Wang, D. (2016) MetaMIS: a metagenomic microbial interaction simulator based on microbial community profiles. *BMC Bioinformatics*, **17** (1), 488.
272. Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., and Patil, K.R. (2018) Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Res.*, **46** (15), 7542–7553.
273. Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P., and Hacquard, S. (2018) Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival. *Cell*, **175** (4), 973-983.e14.
274. García, C., Rendueles, M., and Díaz, M. (2017) Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **40** (7), 1111–1122.
275. Holland, J.N., and Bronstein, J.L. (2008) Mutualism, in *Encyclopedia of Ecology*.
276. Campos RPC, J.J. (2013) Endophytic *Aspergillus* spp. associated with *Plectranthus amboinicus* leaves as potential biocontrol agents against *Fusarium verticillioides*. *Africa's potential Ecol. Intensif. Agric.*, **53** (9), 1689–1699.
277. Pérez, J., Contreras-Moreno, F.J., Marcos-Torres, F.J., Moraleda-Muñoz, A., and Muñoz-Dorado, J. (2020) The antibiotic crisis: how bacterial predators can help. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 2547–2555.
278. de Menezes, A.B., Richardson, A.E., and Thrall, P.H. (2017) Linking fungal-bacterial co-occurrences to soil ecosystem function. *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 135–141.
279. Martin, G., Guggiari, M., Bravo, D., Zopfi, J., Cailleau, G., Aragno, M., Job, D., Verrecchia, E., and Junier, P. (2012) Fungi, bacteria and soil pH: the oxalate-carbonate pathway as a model for metabolic interaction. *Environ. Microbiol.*, **14** (11), 2960–2970.
280. Zhao, X., Liu, X., Xu, X., and Fu, Y. V (2017) Microbe social skill: the cell-to-cell communication between microorganisms. *Sci. Bull.*, **62** (7), 516–524.
281. Benoit, I., van den Esker, M.H., Patyshakuliyeva, A., Mattern, D.J., Blei, F., Zhou, M., Dijksterhuis, J., Brakhage, A.A., Kuipers, O.P., de Vries, R.P., and Kovács, Á.T. (2015) *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environ. Microbiol.*, **17** (6), 2099–2113.
282. Hutchings, M.I., Truman, A.W., and Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.*, **51**, 72–80.
283. Weisskopf, L., Ryu, C.-M., Raaijmakers, J., and Garbeva, P. (2016) Editorial: Smelly fumes - volatile - mediated communication between bacteria and other organisms. *Front. Microbiol.*, **7**, 2031.
284. Khalid, S., and Keller, N.P. (2021) Chemical signals driving bacterial–fungal

- interactions. *Environ. Microbiol.*, **23** (3), 1334–1347.
285. Li, L., Qu, Q., Tian, B., and Zhang, K.Q. (2005) Induction of chlamydo spores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* C2. *J. Phytopathol.*, **153** (11-12), 686–693.
286. Ortega, H.E., Ferreira, L.L.G., Melo, W.G.P., Oliveira, A.L.L., Ramos Alvarenga, R.F., Lopes, N.P., Bugni, T.S., Andricopulo, A.D., and Pupo, M.T. (2019) Antifungal compounds from *Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **13** (8), e0007643.
287. Uehling J, Deveau A, P.M. (2017) Innate immune response and NLR based non-self recognition in Fungi, Plants and Animals. *Pearls PLoS Pathog.*
288. Deveau, A., Barret, M., Diedhiou, A.G., Leveau, J., de Boer, W., Martin, F., Sarniguet, A., and Frey-Klett, P. (2015) Pairwise transcriptomic analysis of the interactions between the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and three beneficial, neutral and antagonistic soil bacteria. *Microb. Ecol.*, **69** (1), 146–159.
289. Deveau A, Bonito G, Uehling J, Paoletti M, Becker M, Bindschedler S, Hacquard S, Herve V, Labbe J, Lastovetsky OA, Mieszkina S, Millet LJ, Vajna B, Junier P, Bonfante P., Krom BP, Olsson S, van Elsas JD, W.L. (2018) Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol. Rev.*, **42**, 335–352.
290. Warmink, J.A., Nazir, R., and van Elsas, J.D. (2009) Universal and species-specific bacterial “fungiphiles” in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environ. Microbiol.*, **11** (2), 300–312.
291. Lackner, G., Partida-Martinez, L.P., and Hertweck, C. (2009) Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. *Trends Microbiol.*, **17** (12), 570–576.
292. Schulz-Bohm, K., Tyc, O., de Boer, W., Peereboom, N., Debets, F., Zaagman, N., Janssens, T.K.S., and Garbeva, P. (2017) Fungus-associated bacteriome in charge of their host behavior. *Fungal Genet. Biol.*, **102**, 38–48.
293. Hoffman, M.T., Gunatilaka, M.K., Wijeratne, K., Gunatilaka, L., and Arnold, A.E. (2013) Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. *PLoS One*, **8** (9), e73132.
294. Schink, B. (2002) Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81** (1), 257–261.
295. Ghignone, S., Salvio, A., Anca, I., Lumini, E., Ortu, G., Petiti, L., Cruveiller, S., Bianciotto, V., Piffanelli, P., Lanfranco, L., and Bonfante, P. (2012) The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions. *ISME J.*, **6** (1), 136–145.
296. Zhang, W., Li, X.-G., Sun, K., Tang, M.-J., Xu, F.-J., Zhang, M., and Dai, C.-C. (2020) Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. *ISME J.*, **14** (4), 1015–1029.
297. Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., and Gagnaire, V. (2020) Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. *Front. Microbiol.*, **11**, 2088.

298. Brenner, K., You, L., and Arnold, F.H. (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.*, **26** (9), 483–489.
299. Lilja, E.E., and Johnson, D.R. (2019) Substrate cross-feeding affects the speed and trajectory of molecular evolution within a synthetic microbial assemblage. *BMC Evol. Biol.*, **19** (1), 129.
300. Froese, A.G., and Sparling, R. (2021) Cross-feeding and wheat straw extractives enhance growth of *Clostridium thermocellum*-containing co-cultures for consolidated bioprocessing. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **44** (4), 819–830.
301. Harcombe, W.R., Riehl, W.J., Dukovski, I., Granger, B.R., Betts, A., Lang, A.H., Bonilla, G., Kar, A., Leiby, N., Mehta, P., Marx, C.J., and Segrè, D. (2014) Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics. *Cell Rep.*, **7** (4), 1104–1115.
302. Pande, S., Merker, H., Bohl, K., Reichelt, M., Schuster, S., De Figueiredo, L.F., Kaleta, C., and Kost, C. (2014) Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. *ISME J.*, **8** (5), 953–962.
303. Hammarlund, S.P., Chacón, J.M., and Harcombe, W.R. (2019) A shared limiting resource leads to competitive exclusion in a cross-feeding system. *Environ. Microbiol.*, **21** (2), 759–771.
304. Hoek, T.A., Axelrod, K., Biancalani, T., Yurtsev, E.A., Liu, J., and Gore, J. (2016) Resource availability modulates the cooperative and competitive nature of a microbial cross-feeding mutualism. *PLOS Biol.*, **14** (8), e1002540.
305. Clarke, K.G. (2013) Microbiology, in *Bioprocess Engineering* (eds. Clarke, K.G.B.T.-B.E.), Woodhead Publishing, pp. 7–24.
306. Bothe H, Ferguson SJ, N.W. (2007) *Biology of Nitrogen Cycle*.
307. Stein, L.Y., and Klotz, M.G. (2016) The nitrogen cycle. *Curr. Biol.*, **26** (3), R94–R98.
308. Amin, U., and Akhtar, N. (2017) Effect of fungicides on nitrate uptake and assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Sci.*, **27** (2), 550–558.
309. Goddard, A.D., Bali, S., Mavridou, D.A.I., Luque-Almagro, V.M., Gates, A.J., Dolores Roldán, M., Newstead, S., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. (2017) The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters—probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Mol. Microbiol.*, **103** (1), 117–133.
310. Sengupta, S., Shaila, M.S., and Rao, G.R. (1996) Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. *Biochem. J.*, **317** (1), 147–155.
311. Kanamori, K., Weiss, R.L., and Roberts, J.D. (1987) Ammonia assimilation in *Bacillus polymyxa*. 15N NMR and enzymatic studies. *J. Biol. Chem.*, **262** (23), 11038–11045.
312. Lin, J.T., and Stewart, V. (1997) Nitrate assimilation by bacteria, vol. 39,

- Academic Press, pp. 1–30.
313. Shi, W., Lu, W., Liu, Q., Zhi, Y., and Zhou, P. (2014) The identification of the nitrate assimilation related genes in the novel *Bacillus megaterium* NCT-2 accounts for its ability to use nitrate as its only source of nitrogen. *Funct. Integr. Genomics*, **14** (1), 219–227.
314. Garrett, R.H., and Amy, N.K. (1979) Nitrate assimilation in fungi, vol. 18, Academic Press, pp. 1–65.
315. Davis, D.A., Lynch, H.C., and Varley, J. (1999) The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microb. Technol.*, **25** (3), 322–329.
316. Danielson, R.M., and Davey, C.B. (1973) Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.*, **5** (5), 505–515.
317. Syrett, P.J., and Morris, I. (1963) The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Enzymol. Subj.*, **67**, 566–575.
318. Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol. Biol. Oxid.*, **113** (1), 51–56.
319. Wang, H., and Gunsalus, R.P. (2000) The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. *J. Bacteriol.*, **182** (20), 5813 LP – 5822.
320. Morozkina, E. V, and Kurakov, A. V (2007) Dissimilatory nitrate reduction in fungi under conditions of hypoxia and anoxia : a review. **43** (5), 544–549.
321. Sun, Y., De Vos, P., and Willems, A. (2018) Influence of nitrate and nitrite concentration on N₂O production via dissimilatory nitrate/nitrite reduction to ammonium in *Bacillus paralicheniformis* LMG 6934. *Microbiologyopen*, **7** (4), e00592.
322. Konohana, T., Murakami, S., Nanmori, T., Aoki, K., and Shinke, R. (1993) Nitrate reduction in *Bacillus licheniformis* in the presence of ammonium salt by shaking culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57** (7), 1082–1086.
323. Hoffmann, T., Frankenberg, N., Marino, M., and Jahn, D. (1998) Ammonification in *Bacillus subtilis*: utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on resDE. *J. Bacteriol.*, **180** (1), 186 LP – 189.
324. van den Berg, E.M., van Dongen, U., Abbas, B., and van Loosdrecht, M.C.M. (2015) Enrichment of DNRA bacteria in a continuous culture. *ISME J.*, **9** (10), 2153–2161.
325. Huang, X., Weisener, C.G., Ni, J., He, B., Xie, D., and Li, Z. (2020) Nitrate assimilation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and denitrification coexist in *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions. *Bioresour. Technol.*, **312**, 123597.
326. Nett, M., Ikeda, H., and Moore, B.S. (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, **26** (11), 1362–

- 1384.
327. Wiemann, P., and Keller, N.P. (2014) Strategies for mining fungal natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41** (2), 301–313.
328. Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., and Kolter, R. (2013) Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *MBio*, **4** (4), e00459-13.
329. Lutz, M.P., Wenger, S., Maurhofer, M., Défago, G., and Duffy, B. (2004) Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **48** (3), 447–455.
330. del Barrio-Duque, A., Samad, A., Nybroe, O., Antonielli, L., Sessitsch, A., and Compant, S. (2020) Interaction between endophytic *Proteobacteria* strains and *Serendipita indica* enhances biocontrol activity against fungal pathogens. *Plant Soil*, **451** (1–2), 277–305.
331. Lewis, K., Epstein, S., D’Onofrio, A., and Ling, L.L. (2010) Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **63** (8), 468–476.
332. Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., and Wolfender, J.L. (2014) Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol. Adv.*, **32** (6), 1180–1204.
333. Stanley, C.E., Stöckli, M., Van Swaay, D., Sabotič, J., Kallio, P.T., Künzler, M., Demello, A.J., and Aebi, M. (2014) Probing bacterial-fungal interactions at the single cell level. *Integr. Biol. (United Kingdom)*, **6** (10), 935–945.
334. Klitgord, N., and Segrè, D. (2010) Environments that induce synthetic microbial ecosystems. *PLOS Comput. Biol.*, **6** (11), e1001002.
335. Moussa, M., Ebrahim, W., Kalscheuer, R., Liu, Z., and Proksch, P. (2020) Co-culture of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* with the fungus *Fusarium tricinctum* induces bacterial antifungal and quorum sensing signaling molecules. *Phytochem. Lett.*, **36**, 37–41.
336. Ola, A.R.B., Thomy, D., Lai, D., and Proksch, P. (2013) Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *J Nat Prod*, **76** (11), 2094–2099.
337. Goers, L., Freemont, P., and Polizzi, K.M. (2014) Co-culture systems and technologies : taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface*, **11** (96), 20140065.
338. Patel, S.K.S., Kumar, V., Mardina, P., Li, J., Lestari, R., Kalia, V.C., and Lee, J.-K. (2018) Methanol production from simulated biogas mixtures by co-immobilized *Methylomonas methanica* and *Methylocella tundrae*. *Bioresour. Technol.*, **263**, 25–32.
339. Zheng, C., Zhao, L., Chen, G., Zhou, Y., Pang, Y., and Huang, Y. (2012) Quantitative study of the dynamic tumor–endothelial cell interactions through an integrated microfluidic coculture system. *Anal. Chem.*, **84** (4), 2088–2093.
340. Heyse, J., Buyschaert, B., Props, R., Rubbens, P., Skirtach, A.G., Waegeman,

- W., and Boon, N. (2019) Coculturing bacteria leads to reduced phenotypic heterogeneities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **85** (8), 2814–2818.
341. Salerno, S., Curcio, E., Bader, A., Giorno, L., Drioli, E., and De Bartolo, L. (2018) Gas permeable membrane bioreactor for the co-culture of human skin derived mesenchymal stem cells with hepatocytes and endothelial cells. *J. Memb. Sci.*, **563**, 694–707.
342. Taniguchi, M., and Tanaka, T. (2004) Clarification of interactions among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **90**, 35–62.
343. Zhang, H., and Wang, X. (2016) Modular co-culture engineering, a new approach for metabolic engineering. *Metab. Eng.*, **37**, 114–121.
344. Wu, Q., Ni, M., Dou, K., Tang, J., Ren, J., Yu, C., and Chen, J. (2018) Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microb. Cell Fact.*, **17** (1), 1–12.
345. Karuppiyah, V., Sun, J., Li, T., Vallikkannu, M., and Chen, J. (2019) Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. *Front. Microbiol.*, **10** (MAY), 1–16.
346. Karuppiyah, V., Vallikkannu, M., Li, T., and Chen, J. (2019) Simultaneous and sequential based co-fermentations of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841: a strategy to enhance the gene expression and metabolites to improve the bio-control and plant growth promoting activity. *Microb. Cell Fact.*, **18** (1), 1–16.
347. Karuppiyah, V., Li, Y., Sun, J., Vallikkannu, M., and Chen, J. (2020) Vell regulates the growth of *Trichoderma atroviride* during co-cultivation with *Bacillus amyloliquefaciens* and is essential for wheat root rot control. *Biol. Control*, **151**, 104374.
348. Li, T., Tang, J., Karuppiyah, V., Li, Y., Xu, N., and Chen, J. (2020) Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biol. Control*, **140** (June 2019), 104122.
349. Izquierdo-García, L.F., González-Almario, A., Cotes, A.M., and Moreno-Velandia, C.A. (2020) *Trichoderma virens* G1006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling *Fusarium* wilt of cape gooseberry. *Sci. Rep.*, **10** (1), 1–13.
350. Silva Guachamín AD (2018) Acción in vitro de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como controladores biológicos conjuntos contra *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana*), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador.
351. Vassaux, A., Tarayre, C., Arguëlles-Arias, A., Compère, P., Delvigne, F., Fickers, P., Jahn, L., Lang, A., Leclère, V., Ludwig-Müller, J., Ongena, M.,

- Schaffhauser, T., Telek, S., Théâtre, A., Berkel, W.J.H., Vandenbol, M., Pée, K., Willems, L., Wohlleben, W., and Jacques, P. (2019) Astin C production by the endophytic fungus *Cyanoderrella asteris* in planktonic and immobilized culture conditions. *Biotechnol. J.*, 1800624.
352. Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., and Jacques, P. (2019) Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Front. Microbiol.*, **10** (OCT), 1–10.
353. Béchet, M., Castéra-Guy, J., Guez, J.-S., Chihib, N.-E., Coucheney, F., Coutte, F., Fickers, P., Leclère, V., Wathelet, B., and Jacques, P. (2013) Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresour. Technol.*, **145**, 264–270.
354. Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., Van Den Hondel, C.A.M.J.J., and Asther, M. (2002) Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **269** (2), 602–609.
355. Gao, A., Fishcher-Jenssen, J., Cooper, C., Li, H., Li, J., Chen, S., and Martos, P. (2018) Evaluation of a multiplex PCR for detection of the top seven shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ready-to-eat meats, fruits, and vegetables. *J. AOAC Int.*, **101** (6), 1828–1832.
356. Villa-Rodríguez, E., Ibarra-Gámez, C., and de los Santos-Villalobos, S. (2018) Extraction of high-quality RNA from *Bacillus subtilis* with a lysozyme pretreatment followed by the Trizol method. *J. Microbiol. Methods*, **147** (February), 14–16.
357. Guez, J.S., Coutte, F., Drucbert, A.S., Chihib, N.E., Danzé, P.M., and Jacques, P. (2009) Resistance of the cell wall to degradation is a critical parameter for isolation of high quality RNA from natural isolates of *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.*, **191** (8), 669–673.
358. J. Livak, K., and Thomas D., S. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*.
359. Zhang, Y., Gao, X., Wang, S., Zhu, C., Li, R., and Shen, Q. (2018) Application of *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 enhanced plant growth associated with efficient rhizospheric colonization monitored by qPCR with primers designed from the whole genome sequence. *Curr. Microbiol.*, **75** (12), 1574–1583.
360. Manter, D.K., and Vivanco, J.M. (2007) Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *J. Microbiol. Methods*, **71** (1), 7–14.
361. Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J.M. (2006) Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (11), 7148–7155.
362. Gerin, D., Pollastro, S., Raguseo, C., De Miccolis Angelini, R.M., and Faretra,

- F. (2018) A ready-to-use single- and duplex-TaqMan-qPCR assay to detect and quantify the biocontrol agents *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*. *Front. Microbiol.*, **9**, 2073.
363. Farrelly, V., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (7), 2798 LP – 2801.
364. Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., and Pace, N.R. (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (10), 3417 LP – 3418.
365. Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8** (9), 623–633.
366. Bey, B.S., Fichot, E.B., Dayama, G., Decho, A.W., and Norman, R.S. (2010) Extraction of high molecular weight DNA from microbial mats. *Biotechniques*, **49** (3), 631–640.
367. Corcoll, N., Österlund, T., Sinclair, L., Eiler, A., Kristiansson, E., Backhaus, T., and Eriksson, K.M. (2017) Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.*, **364** (14).
368. Callahan, H. (2010) Improved DNA and RNA isolation from biofilms. *Biotechniques*, **48** (5), 413.
369. Zune, Q., Delepierre, A., Gofflot, S., Bauwens, J., Twizere, J.C., and Punt, P.J. (2015) A fungal biofilm reactor based on metal structured packing improves the quality of a *Gla*:: GFP fusion protein produced by *Aspergillus oryzae*. 6241–6254.
370. Vandermies, M., Kar, T., Carly, F., Nicaud, J., Delvigne, F., and Fickers, P. (2018) *Yarrowia lipolytica* morphological mutant enables lasting *in situ* immobilization in bioreactor. 5473–5482.
371. Khalesi, M., Zune, Q., Telek, S., Riveros-Galan, D., Verachtert, H., Toye, D., Gebruers, K., Derdelinckx, G., and Delvigne, F. (2014) Fungal biofilm reactor improves the productivity of hydrophobin HFBII. *Biochem. Eng. J.*, **88**, 171–178.
372. Ly, S., Kakahi, F.B., Mith, H., Phat, C., Fifani, B., Kenne, T., Fauconnier, M.L., and Delvigne, F. (2019) Engineering synthetic microbial communities through a selective biofilm cultivation device for the production of fermented beverages. *Microorganisms*, **7** (7).
373. Zacchetti, B., Wösten, H.A.B., and Claessen, D. (2018) Multiscale heterogeneity in filamentous microbes. *Biotechnol. Adv.*, **36** (8), 2138–2149.
374. Zune, Q., Soyeurt, D., Toye, D., Ongena, M., Thonart, P., and Delvigne, F. (2014) High-energy X-ray tomography analysis of a metal packing biofilm reactor for the production of lipopeptides by *Bacillus subtilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **89** (3), 382–390.
375. Brück, H.L., Delvigne, F., Dhulster, P., Jacques, P., and Coutte, F. (2019)

- Molecular strategies for adapting *Bacillus subtilis* 168 biosurfactant production to biofilm cultivation mode. *Bioresour. Technol.*, **293**, 122090.
376. Sinde, E., and Carballo, J. (2000) Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.*, **17** (4), 439–447.
377. Pringle, J.H., and Fletcher, M. (1983) Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45** (3), 811–817.
378. Shakerifard, P., Gancel, F., Jacques, P., and Faille, C. (2009) Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling*, **25** (6), 533–541.
379. Smits, T.H.M., Wick, L.Y., Harms, H., and Keel, C. (2003) Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. **5**, 85–91.
380. Hogan, D. a, Wargo, M.J., and Beck, N. (2007) Bacterial biofilms on fungal surfaces. *biofilm mode life Mech. Adapt.*, 235–245.
381. Artursson, V., and Jansson, J.K. (2003) Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (10), 6208–6215.
382. Stanley, P.M. (1983) Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.*, **29** (11), 1493–1499.
383. Ratzke, C., and Gore, J. (2018) Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLOS Biol.*, **16** (3), e2004248.
384. Pande, S., and Kost, C. (2017) Bacterial unculturability and the formation of intercellular metabolic networks. *Trends Microbiol.*, **25** (5), 349–361.
385. Khattabi N, Ezzahiri B, Louali L, O.A. (2004) Effect of nitrogen fertilizers and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii*. *Agronomie*, **24** (5), 281–288.
386. Onilude, A.A., Adebayo-Tayo, B.C., Odeniyi, A.O., Banjo, D., and Garuba, E.O. (2013) Comparative mycelial and spore yield by *Trichoderma viride* in batch and fed-batch cultures. *Ann. Microbiol.*, **63** (2), 547–553.
387. Pollack, A., and Ciancio, G. (1990) Chapter 3 - Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation, in *Flow Cytometry*, vol. 33, Academic Press, pp. 19–24.
388. Fried, J., Perez, A.G., and Clarkson, B.D. (1976) Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J. Cell Biol.*, **71** (1), 172–181.
389. Nikel PI, de L. V (2018) Assessing carbon source - dependent phenotypic variability in *Pseudomonas putida*, in *Cellular heterogeneity Methods and protocols*, pp. 363.
390. Grassi, L., Di Luca, M., Maisetta, G., Rinaldi, A.C., Esin, S., Trampuz, A., and Batoni, G. (2017) Generation of persister cells of *Pseudomonas aeruginosa*

- and *Staphylococcus aureus* by chemical treatment and evaluation of their susceptibility to membrane-targeting agents. *Front. Microbiol.*, **8**, 1917.
391. Kerr, J.R. (1999) Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **11**, 129–142.
392. Wang, J., Liu, J., Chen, H., and Yao, J. (2007) Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76** (4), 889–894.
393. Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., and Thonart, P. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.*, **96** (5), 1151–1160.
394. Kim, W.G., Weon, H.Y., Seok, S.J., and Lee, K.H. (2008) *In vitro* antagonistic characteristics of Bacilli isolates against *Trichoderma* spp. and three species of mushrooms. *Mycobiology*, **36** (4), 266–269.
395. Knight, C.A., Bowman, M.J., Frederick, L., Day, A., Lee, C., and Dunlap, C.A. (2018) The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* strain. *Microbiol. Res.*, **216**, 40–46.
396. Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Ullah, M.A., Sessitsch, A., and Hafeez, F.Y. (2018) Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS One*, **13** (6), e0198107–e0198107.
397. Pakdaman, B.S., Goltapeh, E.M., Soltani, B.M., Talebi, A.A., Nadepoor, M., and Joanna, S. (2013) Toward the quantification of confrontation (dual culture) test : a case study on the biological control of *Pythium aphanidermatum* with *Trichoderma asperelloides*. *J. Biofertilizers Biopestic.*, **4** (2).
398. Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., and Fontana, A. (2020) Commercial biocontrol agents reveal contrasting compartments against two mycotoxigenic fungi in cereals : *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*.
399. Zeilinger, S., Reithner, B., Scala, V., Peissl, I., Lorito, M., and Mach, R.L. (2005) Signal transduction by Tga3, a novel G protein subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Env. Microbiol.*, **71** (31), 1591–1597.
400. Kulimushi, P.Z. (2017) Potentiel de *Bacillus amyloliquefaciens* pour lutter contre les maladies fongiques endémiques du maïs au sud Kivu : efficacité et mode d' action.
401. Cao, Y., Pi, H., Chandrangsou, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D., and Cai, Y. (2018) Antagonism of two plant - growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.*, **8** (1), 4360.
402. Chang, W.-T., Chen, M.-L., and Wang, S.-L. (2010) An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26** (5), 945–950.
403. D'Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., and Kost, C. (2018) Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, **35** (5), 455–488.

404. Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8** (1), 15–25.
405. Horak, I., Engelbrecht, G., van Rensburg, P.J.J., and Claassens, S. (2019) Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *J. Appl. Microbiol.*, **127** (2), 326–343.
406. Chitale, A., Jadhav, D. V., Waghmare, S.R., Sahoo, A.K., and Ranveer, R.C. (2012) Production & characterization of brown coloured pigment from *Trichoderma viride*. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, **11** (5), 529–537.
407. Shaikh, A.S., Tang, Y.J., Mukhopadhyay, A., Martín, H.G., Gin, J., Benke, P.I., and Keasling, J.D. (2010) Study of stationary phase metabolism via isotopomer analysis of amino acids from an isolated protein. *Biotechnol. Prog.*, **26** (1), 52–56.
408. Lam, H., Oh, D.-C., Cava, F., Takacs, C.N., Clardy, J., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2009) D-Amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* (80-.), **325** (5947), 1552–1555.
409. Zhang, J., and Elser, J.J. (2017) Carbon: Nitrogen: Phosphorus stoichiometry in fungi: A meta-analysis. *Front. Microbiol.*, **8** (JUL), 1–9.
410. Tomm, H.A., Ucciferri, L., and Ross, A.C. (2019) Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **46** (9–10), 1381–1400.
411. Park, H.B., Kwon, H.C., Lee, C.-H., and Yang, H.O. (2009) Glionitrin A, an antibiotic–antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. *J. Nat. Prod.*, **72** (2), 248–252.
412. Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D.J., König, C.C., Valiante, V., Schroeckh, V., and Brakhage, A.A. (2015) Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Front. Microbiol.*, **6**, 299.
413. Muñoz-Redondo, J.M., Puertas, B., Cantos-Villar, E., Jiménez-Hierro, M.J., Carbú, M., Garrido, C., Ruiz-Moreno, M.J., and Moreno-Rojas, J.M. (2021) Impact of sequential inoculation with the non-*Saccharomyces T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* combined with *Saccharomyces cerevisiae* strains on chemicals and sensory profile of rosé wines. *J. Agric. Food Chem.*, **69** (5), 1598–1609.
414. Meena, K.R., Tandon, T., Sharma, A., and Kanwar, S.S. (2018) Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **8** (3), 91–98.
415. Bastryk, A., Fiedot-Toboła, M., Polowczyk, I., Legawiec, K., and Płaza, G. (2019) Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **174**, 145–152.
416. Kelsic, E.D., Zhao, J., Vetsigian, K., and Kishony, R. (2015) Counteraction of

antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities.
Nature, **521** (7553), 516–519.