

Thèse de Doctorat

pour l'obtention du grade de

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

Ecole doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Energie

Présentée par **Eléonore MEPHANE**

Conception de cocktails issus de co-cultures de bactéries et champignons pour de nouveaux bio-fongicides

Préparée à l'Institut Charles Violette dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche
transfrontalière BioEcoAgro et à l'Unité de Recherche et de Développement Agro-
Biotechnologies Industrielles (URD ABI) d'AgroParisTech

Soutenue le 12 décembre 2022

Composition du jury :

Vincent PHALIP, Pr	Université de Lille	Directeur de thèse
Nabila IMATOUKENE, CR	AgroParisTech Innovation	Co-encadrante
Florence FONTAINE, Pr	Université de Reims Champagne Ardenne	Rapportrice
Angélique FONTANA, MCF, HDR	Université de Montpellier	Rapportrice
Antoine FAYEULLE, MCF	Université de Technologie de Compiègne	Examinateur
Valérie LECLERE, Pr	Université de Lille	Présidente
Egon HEUSON, CR	Ecole Centrale de Lille	Examinateur
Michel LOPEZ, Pr	AgroParisTech Innovation	Examinateur

VALORISATIONS

Articles en cours

Mephane E., Imatoukene N., Heuson E., Lopez M., Phalip V. : Screening for antifungal activities produced by bacteria-fungi co-cultures through microfermentations – Soumission prévue en 2023 dans *Frontiers in Microbiology*

Communications

Communication orale : Mephane E., Imatoukene N., Heuson E., Lopez M., Phalip V. Use of a Microbioreactor for Screening of Fungal/Bacterial Co-culture Activity against a *Fusarium* Strain – Biotech France 2022, Paris, 15-17 juin 2022.

Poster : Mephane E., Imatoukene N., Heuson E., Lopez M., Phalip V. Use of a Microbioreactor for Screening of Fungal/Bacterial Co-culture Activity against a *Fusarium* Strain – International Symposium Plant BioProtech, Reims, 28-30 juin 2022.

Brevet

Brevet en cours de discussion en vue de protéger les couples d'intérêt révélés dans le cadre de cette thèse – Réunion avec un cabinet de brevet programmée le 19/10/2022.

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier le Pr. Vincent Phalip pour avoir dirigé ma thèse, pour ses conseils et son soutien et ses encouragements même lors des périodes difficiles. Je souhaite également remercier le Dr. Nabila Imatoukene pour m'avoir encadrée lors de ma thèse et avoir rendu mon changement de laboratoire beaucoup plus facile. Merci à tous les deux pour votre patience et pour avoir répondu à toutes mes questions, scientifiques comme moins scientifiques.

Je tiens à remercier le Professeur Florence Fontaine et le Docteur Angélique Fontana pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Professeur Valérie Leclere et le Docteur Antoine Fayeulle d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci au Dr. Egon Heuson de m'avoir aidée et accompagnée sur la plateforme Realcat, pour son soutien sur la prise en main du BioLector et ses conseils lors de ma période sur Lille. Merci également au Pr. Michel Lopez pour son accompagnement à l'URD ABI.

Je remercie également les membres du consortium CO4 pour leur expertise et leurs apports tout au long de ma thèse dès le début du projet : Loïc Levavasseur, Mathieu Allard, Mathilde Grandchamp et Tiphaine Clément.

Je tiens également à remercier les structures qui m'ont accueillie au cours de ma thèse, l'UMRt BioEcoAgro au sein de Polytech Lille et l'URD ABI d'AgroParisTech. Je remercie également AgroParisTech Innovation pour avoir financé ce projet de thèse.

Etant donné que j'ai réalisé ma thèse sur deux sites différents, j'ai eu le plaisir de travailler avec des équipes qui ont pu m'apprendre beaucoup et sans qui cette thèse n'aurait pas pu aller aussi loin. A Lille, je tenais à remercier Roxane Raulo pour toute l'aide apportée sur tout ce qui concerne les champignons et pour les souches qu'elle m'a fournies pour ce travail, et Alexandre Bricout pour son aide sur les tests d'activité antifongique et les *Pseudomonas*, Merci à Barbara Deracinois pour son expertise en protéomique et en peptidomique, et merci à Barbara Fifani pour son aide et ses conseils sur les co-cultures. Merci aussi à Stéphanie et Rémi qui m'ont formée au laboratoire et à la vie à Polytech et m'ont également fourni deux souches de microorganismes qui m'ont au final bien servi.

A Reims, je tenais à remercier Abdouramane Dosso, Fanny Brunissen et Fanny Brunois pour leur travail en analytique et leur soutien sur les interprétations des résultats. Merci à Ludovic Besaury pour son travail sur la partie génomique et métabolomique, ainsi que pour toutes les discussions très enrichissantes qui ont pu en découler. Merci à Blandine Godon pour toute son aide apportée dans la réalisation de co-cultures, et de tests antifongiques. Merci également à Julien Couvreur pour m'avoir formée et guidée sur la cytométrie en flux.

Je ne peux pas oublier tous les amis que j'ai pu rencontrer lors de ma thèse, à Lille, tout d'abord, avec Rémi et Stéphanie avec qui j'ai passé plusieurs mois à isoler des microorganismes du parking de Polytech (ça, ça ne s'invente pas) ; les soirées karaoke dans le L2 c'était quelque chose tout de même ! Merci à tous les amis du bureau, Alice, Barbara, Alexandre Bricout et Alexandre Rulence, Maxime, Angeline (bestie...), Justine, Eva et Théo, pour les pauses café et les discussions parfois bien perchées (le bien fondé de l'eau pétillante. La Reine des neiges. Les

clips de Kpop.), et hors du bureau aussi, Adrien, Ali, Désiré et Laurie-Anne avec qui on a passé de super moments malgré le confinement. Ma première moitié de thèse n'aurait pas été la même sans vous.

A Reims, je pense à Damien, qui m'a prise sous son aile super rapidement et grâce à qui j'ai pu intégrer une bande de potes super sympas ; merci à Valentin, Laure, Etienne, Marie, Fanny pour toutes les soirées jeux passées à bluffer plus ou moins bien et nos déguisements plus ou moins reconnaissables ; merci en particulier au groupe des repas du midi, on a fait tellement de découvertes culinaires grâce à ça ! Merci Laurène pour ton soutien sur la dernière ligne droite (travailler à la bibliothèque porte ses fruits au final) et Kevin pour avoir été l'un des seuls weeb fans de dinosaures au labo. Merci à Blandine pour tous les repas et desserts toujours au top, et les moments karaoke qu'il faut absolument qu'on se refasse. Merci à Horiya pour avoir été ma confidente pendant tout le temps que j'ai passé à Reims, pour nos trajets en train et nos soirées restaurant-glace de l'été. Merci à Floriane, Célestin, Robin et Ying pour toutes les bonnes discussions et les gros délires dans le bureau des doctorants et en dehors. Merci à Benjamin pour avoir été l'autre blob du labo même si au final on n'a pas pu faire l'expérience... Merci à Gaëlle, Quentin, Emilie, Clémence, Fanny pour leur soutien et toutes nos conversations parfois très intéressantes à table.

Merci aussi à tous les colocs que j'ai pu avoir ces trois dernières années, Lucie, Maxime (et Elise), Marine, Solène, Pauline, Valentine, Chloé, Margot, Margaux, Marine, vous m'avez rendue la vie plus douce et plus fun à la fois, avec nos soirées Among Us, hypnose, préparation de liste de Noël, dégustation de champagne et ça peut continuer longtemps comme ça.

Manon, Camille, Alizée, Maud, merci pour les super années passées en prépa ; ça va maintenant faire 10 ans qu'on se connaît, même si je ne réponds vraiment pas assez souvent aux messages – et surtout pas ces derniers temps. Nous voilà toujours en biologie, et j'ai tellement hâte de pouvoir vous revoir plus librement et rattraper le temps perdu. On a déjà commencé avec Manon et c'est une habitude que je ne compte pas perdre, promis !

Merci à mes amis de l'ENSAIA, qui sont tous éparpillés un peu partout maintenant, mais qu'au final j'ai pu revoir au cours de ma thèse. Merci à Joséphine, et Marie, Solenn et Elise pour les beaux souvenirs de l'été 2021 ; merci à Amélie et Jonathan pour ces retrouvailles par hasard puis prévue à Reims, c'est presque comme si on ne s'était jamais quittés. Merci aussi à Paul et Klervi pour les excellents restos et les bons moments pré et post confinement.

Merci à mes amies que je connais maintenant depuis plus de 17 ans (ça commence à faire beaucoup) pour Mégan, et 16 pour Victoria et qui ont toujours été là malgré la distance et les années. Vous pouvez vous doutez que vous allez devoir me supporter à nouveau très bientôt (on se fait un Parc Astérix quand ???¹).

I also want to thank my friends from Crust, who have been an amazing (haha) and incredible support since 2020. Thank you to Tammy, Jaqui, Lillian, Petra, Spence, Kolett, Sam, Salt, Broňa and Luca for everything we've shared (the good times, the bad times, the shit talking and the scalding hot tea) – and everything we will share in the future.

¹ Quelques heures après avoir écrit cette phrase, nous avons effectivement planifié un Parc Astérix, comme quoi...

To my Himbots, I cannot believe how we haven't seen each other yet, I genuinely feel like we've been in a giant sleepover forever together. Thank you Scream, Ameera and Fink for having been there for me, for all your support and your love; you've only ever known me as a PhD student, and here I am! Thank you especially to Fink for being my partner in crime for our writing endeavors and for listening to me ranting about every and any hyperfixation currently rotting my brain (TSOA, JJBA and Stranger Things iykyk). Thank you guys for being absolutely the best. Here Comes The Sun will always be *our* song, promise.

Thank you also to Clown Town, almost gone but not forgotten, you guys were the MVPs of the beginning of my PhD, with our theories and how much we lost our shit in the months following the 3rd season of Stranger Things, I hope we can celebrate when season 5 comes out and the evil is finally defeated.

En particulier je veux remercier les rencontres presque fortuites que j'ai pu faire ces dernières années, en dehors du cadre de la thèse ; Cassy, merci de m'avoir fait découvrir Bruxelles et les frites belges et pour toutes nos conversations bien trop centrées sur la fameuse série créée par les Duffer Brothers ; merci à Lucine, voisine de région avec le meilleur cadeau de Noël jamais envoyé (Should I stay or should I go now~), les délires sur Antoine Daniel et Joey Batey, la seule frenchie de Crust TMTC sisi ; merci à Morgiane pour toutes les conversations où on se demandait si on n'était pas la même personne en fait et les recs de films (d'horreur) et de séries (d'horreur) même si la 3^{ème} année de thèse m'a transformée en fantôme. Merci à Paul, le bff que je n'attendais pas, on s'est tellement bien trouvés que j'en perds mes mots tu vois. Stan Red Velvet et stream 28 Reasons de Seulgi ou sinon . Fais gaffe.

Merci aux cousins pour tous les cinés, restaurants, moments improbables passés – la session glace à 23 h en avril à la BNF ça ne s'oublie pas – merci à Vivien, Noâm, Anaïs et Roman pour les meetups de cousins. En particulier merci à Pauline et Salomé, cousines et copines de galère académique, nous nous comprenons même en venant de domaines complètement différents. Merci à ma tante Michèle et à son expérience, ainsi qu'aux inépuisables comparaisons entre nous deux qui m'ont aussi probablement menée là où je suis à présent.

Merci à ma maman, ma plus grande fan et qui me soutient dans tous mes projets depuis un bon moment maintenant. Ça fait des années que je la bassine sur la thèse, et me voilà ici maintenant. J'espère que tu es fière de moi !

Enfin, je tenais à remercier mes grand parents, Papi Télus et Mamie Olympe, qui m'ont élevée et soutenue comme si j'étais leur propre enfant. Sans eux, je ne serai pas là où je suis. Merci aussi à Mamie Claire ; j'aurais aimé que vous puissiez voir le fruit de ce travail, et je vous dédie ma thèse.

TABLE DES MATIERES

VALORISATIONS	II
REMERCIEMENTS.....	III
LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
INTRODUCTION GENERALE.....	2
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
1. MALADIES FONGIQUES	11
1.1 Exemple de maladies fongiques : focus sur <i>Fusarium</i>	11
1.2 Impacts de <i>Fusarium</i> (économique, organoleptique, sanitaire).....	14
2. MOYENS DE LUTTE CONVENTIONNELS : PESTICIDES DE SYNTHESE.....	16
2.1 Fongicides utilisés contre les maladies cryptogames : le cas de <i>Fusarium</i>	16
2.1.1 Fongicides utilisés contre <i>Fusarium graminearum</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>	16
2.1.2 Mode d'action des fongicides chimiques	17
2.2 Limites des pesticides.....	17
2.2.1 Résistance	18
2.2.2 Impact sur l'environnement.....	19
2.2.3 Impacts sur la santé humaine.....	19
3. UNE SOLUTION ALTERNATIVE AUX FONGICIDES DE SYNTHESE : LE BIOCONTROLE	21
3.1 Définition du biocontrôle.....	22
3.2 Avantages du biocontrôle.....	24
3.3 Substances naturelles.....	25
3.4 Microorganismes	26
3.5 Applications pratiques : solutions utilisées contre <i>Fusarium</i>	27
3.6 Limites du biocontrôle	27
4. METHODES POUR TROUVER DE NOUVELLES ACTIVITES : LE CAS DE LA CO-CULTURE.....	30
4.1 Définition : Qu'est-ce que la co-culture ?	30
4.2 Différents types de co-cultures.....	32
4.2.1 Co-cultures impliquant des espèces similaires jusqu'à des genres différents	33
4.2.2 Niveau de contact entre les organismes co-cultivés	33
4.2.3 Type de milieu.....	35
4.2.4 Densité de la population : jouer sur l'inoculation.....	36
4.2.5 Echelle de temps de la co-culture	36

5.	MICROORGANISMES	37
5.1	<i>Champignons utilisés dans le biocontrôle</i>	38
5.1.1	<i>Trichoderma</i>	38
5.1.2	<i>Aspergillus</i>	43
5.1.3	Autres exemples de champignons	47
5.2	<i>Bactéries</i>	51
5.2.1	<i>Bacillus</i>	52
5.2.2	<i>Pseudomonas</i>	57
5.2.3	<i>Streptomyces</i>	60
5.2.4	Les bactéries lactiques	64
6.	OBJECTIF DE LA THESE	68
CHAPITRE 2 : SELECTION DES MICROORGANISMES		70
1.	INTRODUCTION	72
2.	CRITERES DE SELECTIONS DES SOUCHES ET RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	72
2.1	<i>Critères de choix pour la mise en place de co-cultures</i>	72
2.2	<i>Etude bibliographique</i>	73
3.	SELECTION DES SOUCHES, DES MILIEUX DE CULTURES ET PREMIERES MISES EN ŒUVRE.	86
3.1	<i>Sélection des souches</i>	86
3.2	<i>Milieu de culture pour des co-cultures</i>	87
3.3	<i>Essais préliminaires</i>	91
4.	CONCLUSION	95
CHAPITRE 3 : CRIBLAGES PRIMAIRE ET SECONDAIRE DES MICROORGANISMES CHOISIS POUR LEUR ACTIVITE ANTIFONGIQUE.....		96
1.	INTRODUCTION	98
2.	MATERIELS ET METHODES.....	99
2.1	<i>Matériel bactérien et fongique</i>	99
2.2	<i>Conditions de culture</i>	99
2.3	<i>Criblage primaire : Conditions de microfermentation</i>	100
2.4	<i>Criblage secondaire pour les activités antifongiques</i>	100
2.5	<i>Tests d'activité antifongique</i>	101
2.5.1	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antifongique témoin	101
2.5.2	Tests d'activité antifongique sur boîte.....	102
2.5.3	Tests d'activité antifongique en milieu liquide.....	102
2.6	<i>Cytométrie en flux</i>	104
3.	RESULTATS	106
3.1	<i>Criblage primaire des surnageants de co-cultures pour leur activité antifongique</i>	106

3.2	<i>Criblage secondaire</i>	111
3.2.1	Criblage secondaire des co-cultures sélectionnées	111
3.2.2	Réflexion sur l'originalité des co-cultures.....	113
3.3	<i>Validation du criblage secondaire pour des activités antifongiques</i>	116
3.3.1	Suivi du développement des microorganismes.....	116
3.3.2	Tests d'activité antifongique en milieu gélosé	118
3.3.3	Suivi du développement des microorganismes en mono- et co-culture par mesure de matière sèche	127
3.4	<i>Tests d'activité antifongique en milieu liquide</i>	130
3.4.1	Première phase de tests.....	130
3.4.2	Deuxième phase de tests.....	134
3.5	<i>Cytométrie en flux</i>	137
4.	DISCUSSION	141
5.	CONCLUSION	146
CHAPITRE 4 : ANALYSE DES SURNAGEANTS DE CULTURE.....		148
1.	INTRODUCTION	150
2.	MATERIELS ET METHODES.....	151
2.1	<i>Caractéristiques du génome</i>	151
2.2	<i>Analyses en LC-MS Q-TOF</i>	151
2.2.1	Préparation et analyse des échantillons	151
2.2.2	Traitement des données	152
2.3	<i>Analyses protéomiques et peptidomiques</i>	153
2.3.1	Séparation de la partie protéique et de la partie peptidique par chromatographie d'exclusion stérique	153
2.3.2	Préparation de la partie protéique avant analyse LC-MS/MS.....	153
2.3.3	Identification des protéines et des peptides par UPLC-MS/MS	153
3.	RESULTATS	156
3.1	<i>Potentiel de production des différents microorganismes</i>	156
3.2	<i>Métabolites produits</i>	157
3.2.1	Comparaison des spectres.....	157
3.2.2	Métabolites sécrétés par les différentes cultures.....	157
3.3	<i>Analyses protéomiques</i>	171
4.	DISCUSSION	182
5.	CONCLUSION	189
CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES		190
1.	CONCLUSION GENERALE	192
2.	PERSPECTIVES	195

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	198
ANNEXES	250
A. INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES DU CHAPITRE 3	252
B. INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES DU CHAPITRE 4	279

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant les deux grandes parties du projet de thèse : criblage d'activités antifongiques des co-cultures en microbioréacteur après sélection de microorganismes (WP1), puis fermentations en plus grand volume des couples retenus pour une analyse de leurs sécrétions métaboliques dans une optique de détermination d'activité antifongique (WP2).....	6
Figure 2 : Cycle de vie de <i>Fusarium graminearum</i> au champ – phase sexuelle, <i>Gibberella zeae</i> (adapté de Trail, 2009).	13
Figure 3 : Symptômes au champ engendrés par des maladies causées par <i>Fusarium</i> : la fusariose vasculaire du lin (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>) (A), et la fusariose du blé (<i>Fusarium graminearum</i>) (B) – Photos issues de l'institut du végétal ARVALIS.	14
Figure 4 : Aperçu du marché du biocontrôle : A) Part du marché du biocontrôle dans les ventes de produits pour la protection des plantes en France en 2021, selon les catégories d'agents de biocontrôle considérés. B) Evolution des parts du marché du biocontrôle selon les segments (insecticides, molluscicides, fongicides et herbicides) entre 2020 et 2021 (IBMA).	22
Figure 5 : Occurrence du mot co-culture dans les publications récentes, recherchées comme mot-clé sur Scopus et Web of Science pour les années 2000 à 2021.	31
Figure 6 : Exemples de niveaux de contact entre des populations de cellules mises en co-culture : A) Les cellules peuvent être séparées mais leurs productions peuvent s'échanger dans un même milieu, B) Les cellules peuvent être séparées et cultivées dans des conditions différentes, et échanger des productions gazeuses, C) Les cellules peuvent être en contact dans le même milieu et leurs productions s'échanger.....	34
Figure 7 : A) Prise de vue d'une colonie de <i>Trichoderma harzianum</i> sur PDA, échelle 1,5 mm ; B) Conidiophores de <i>Trichoderma rosulatum</i> après 40 jours de croissance, échelle 10 µm ; C) Conidies de <i>Trichoderma rosulatum</i> , échelle 5 µm (B, C : Zhu, Zhuang 2015).....	39
Figure 8 : A) Prise de vue d'une colonie d' <i>Aspergillus oryzae</i> sur PDA, échelle 1 cm ; B) Prise de vue d'une colonie d' <i>Aspergillus oryzae</i> sur PDA, échelle 1,5 mm ; C) Conidiophore d' <i>Aspergillus ochraceus</i> , échelle 10 µm (Samson et al. 2014).....	44
Figure 9 : A) Prise de vue d'une colonie de <i>Cladosporium cladosporioides</i> sur PDA, échelle 1 cm ; B) Prise de vue d'une colonie de <i>Cladosporium cladosporioides</i> sur PDA, échelle 1,5 mm ; C) Conidiophores et chaîne de conidies de <i>Cladosporium aphidis in vitro</i> , échelle 10 µm (Bensch et al. 2012).....	48
Figure 10 : A) Prise de vue d'un étalement de <i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247 sur NB, échelle 5 mm ; B) Morphologie de <i>Pseudozyma aphidis</i> en culture liquide YM à 30 °C, échelle 10 µm (Kitamoto 2019).	49

Figure 11 : A) Cellules de <i>Bacillus subtilis</i> , échelle 2 μm ; B) Cellules de <i>Bacillus licheniformis</i> , échelle 2 μm (A, B : Logan, Vos 2015) ; C) Prise de vue d'un étalement de <i>Bacillus subtilis</i> sur NB, échelle 5 mm.	53
Figure 12 : A) Prise de vue de <i>Streptomyces coelicolor</i> M145 sur MYM, échelle 1,5 mm ; B) Prise de vue de <i>Streptomyces</i> sp. S0162 sur MYM, échelle 1,5 mm ; C) Chaîne de spores de <i>Streptomyces griseus</i> (MEB), échelle 2 μm ; D) Spores lisses de <i>Streptomyces niveus</i> (MEB), échelle 0,25 μm (C, D : Kämpfer 2015).	61
Figure 13 : Micrographes à contraste de phase montrant différentes morphologies de LAB : A) Cellules de <i>Lactobacillus minor</i> ; B) <i>Lactobacillus fermentum</i> , échelle 10 μm (Hammes, Hertel 2015).....	65
Figure 14 : Exemples de mise en culture de champignons pour les tests de croissance dans les milieux standard, riche et minimum (ici PDB, NB et GMM respectivement), pour T.h. : <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai MUCL 29707, A.o. : <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, P.a. : <i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247 et C.c. : <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6.	92
Figure 15 : Exemples de suivi de croissance par DO ₆₀₀ de différents microorganismes (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332, <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai MUCL 29707 et <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6) dans les milieux choisis standards (respectivement LB, KB et PDB), riche (NB) et minimum (GMM).	93
Figure 16 : Courbe d'étalonnage obtenues après mesure de DO ₆₀₀ et comptage de cellules pour <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332, <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, <i>Dietzia</i> sp. DM01 et <i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247.....	99
Figure 17 : BioLector (m2p-labs) utilisé dans cette étude.	100
Figure 18 : Croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> BRRC7 (matières sèches en g/L) dans le milieu PDB et le milieu LB lyophilisé resuspendu dans du PDB, pendant 7 jours.....	103
Figure 19 : Culture en BioLector et criblage primaire. A) Exemple d'un plan de plaque ; B) Photo d'une plaque après 4 jours de culture ; C) exemple d'un test d'activité antifongique contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
Figure 20 : Exemples de graphes de suivi de biomasse sur le BioLector : comparaisons entre des monocultures (<i>Streptomyces</i> sp. S0162, <i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332, <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, <i>Dietzia</i> sp. DM01 et <i>Streptomyces coelicolor</i> M145) cultivées dans deux plaques différentes dans le milieu NB.	107
Figure 21 : A. Diamètres d'inhibition (mm) observés avec les surnageants des différentes monocultures et co-cultures cultivées dans différents milieux (NB, LB et GMM) dans un microbioréacteur, déposés dans des puits sur des plaques de gélose. B. Plaques de gélose utilisées	

pour cribler l'activité antifongique des surnageants contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (en haut) et <i>Fusarium oxysporum</i> (en bas).	109
Figure 22 : A) Diamètres d'inhibition observés avec des surnageants concentrés (x 20) générés dans les milieux NB et LB contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> . Les surnageants proviennent des dix co-cultures sélectionnées à l'issue du premier criblage (<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Pseudozyma aphidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Pseudozyma aphidis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Dietzia</i> sp. + <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Dietzia</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> et <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i>). B) Photos de boîtes de Petri utilisées pour cribler l'activité antifongique des surnageants concentrés (cibles <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à gauche et <i>Fusarium oxysporum</i> à droite).	112
Figure 23 : Recherches par mots clés sur Web of Science (effectuées en juin 2021) : genres sélectionnés + mots clés choisis (« biocontrôle », « métabolite secondaire », « antifongique ») et co-cultures choisies + « co-culture »	114
Figure 24 : Exemple de développement de monocultures (<i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6, <i>Streptomyces</i> sp. S0162 et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72) et de co-cultures (<i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i> et <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i>) après 5 jours de croissance en milieu LB.	117
Figure 25 : Diamètres d'inhibition (mm) des différents surnageants filtrés et concentrés (x 20 - A, B ; x 10 - C, D ; et x 5 - E, F) des cultures réalisées en milieu LB (les monocultures : <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, <i>Streptomyces</i> sp. S0162, <i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247, <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6, <i>Fusarium oxysporum</i> BRCCR7 et les co-cultures : <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Pseudozyma aphidis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i>) contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A, C, E) et <i>Fusarium oxysporum</i> (B, D, F) sur des plaques de gélose PDA. Des lettres différentes (a-f) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student).	120
Figure 26 : Diamètres d'inhibition (mm) des différents surnageants filtrés et concentrés (x20 - A, B ; x10 - C, D ; et x5 - E) des cultures réalisées en milieu NB (les monocultures : <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, <i>Streptomyces</i> sp. S0162, <i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247, <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6, <i>Fusarium oxysporum</i> BRCCR7 et les co-cultures : <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Pseudozyma aphidis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i>) contre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A, C) et	

Fusarium oxysporum (**B, D, E**) sur des plaques de gélose PDA. Des lettres différentes (a-f) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student)..... 123

Figure 27 : Diamètres d'inhibition (mm) des différents surnageants filtrés et concentrés (x 20) des cultures réalisées **en milieu LB** (les monocultures : *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et les co-cultures : *Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) contre *Saccharomyces cerevisiae* (**A**) et *Fusarium oxysporum* (**B**) sur des plaques de gélose PDA. Des lettres différentes (a-h) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,05$, test de Student)..... 125

Figure 28 : Matières sèches (g/L) obtenues à l'issue des mono (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Dietzia* sp. + *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*) générées **en milieu LB (A) et NB (B)**. Des lettres différentes (a-i) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student)..... 127

Figure 29 : Matières sèches (g/L) obtenues à l'issue des mono (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, et *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) générées **en milieu LB**. Des lettres différentes (a-d) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,05$, test de Student)..... 129

Figure 30 : Matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 5 jours à l'issue des tests d'activité antifongique en milieu liquide à partir de surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Dietzia* sp. + *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*) générés dans les **milieux LB (A) et NB (B)** et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu

PDB. Des lettres différentes (a-h) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student). 130

Figure 31 : Pourcentage d'inhibition obtenus à partir de matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 5 jours de croissance en présence des différents surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Dietzia* sp. + *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae* générés dans les milieux **LB (A)** et **NB (B)** et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu. 133

Figure 32 : Matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 2 jours (**A**) et 5 jours (**B**) de croissance à l'issue de tests d'activité antifongique en milieu liquide à partir de surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, et *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) générés dans le milieu LB et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu PDB. Des lettres différentes (a-g) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,05$, test de Student). L'amphotéricine B a été utilisé comme témoin positif aux concentrations 2, 4, 8 et 16 $\mu\text{g/mL}$, et le milieu LB resuspendu dans du PDB comme témoin de croissance. 134

Figure 33 : Pourcentage d'inhibition obtenus à partir de matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 2 jours (**A**) et 5 jours (**B**) de croissance en présence des différents surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, et *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) générés dans le milieu LB et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu PDB. L'amphotéricine B a été utilisé comme témoin positif aux concentrations 2, 4, 8 et 16 $\mu\text{g/mL}$, et le milieu LB resuspendu dans du PDB comme témoin de croissance. 136

Figure 34 : Prises de vues des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* observées au microscope (grossissement x 400) après 48 h de croissance en présence d'amphotéricine B à 2 $\mu\text{g/mL}$ et des surnageants de culture d'*Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Streptomyces* sp. S0162 et

<i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> . Un témoin de croissance, sans surnageant ou molécule antifongique, est également présenté.....	138
Figure 35 : Résultats de cytométrie en flux après 24 et 48 h, avec un échantillon témoin de croissance, un témoin Amphotéricine B (2 µg/mL), et trois échantillons contenant les surnageants lyophilisés d' <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, de <i>Streptomyces</i> sp. S0162 et de la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i>	139
Figure 36 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires dans les monocultures des bactéries P.s. : <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 et S0162 : <i>Streptomyces</i> sp. S0162, déterminées par LC-MS Q-TOF : A) Molécules produites par <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 seul sur un total de 46 pics. B) Molécules produites par <i>Streptomyces</i> sp. S0162 seul sur un total de 47 pics.....	158
Figure 37 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires dans les monocultures des champignons A.o. : <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 et C.c. : <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6, déterminées par LC-MS Q-TOF : A) Molécules produites par <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 seul sur un total de 47 pics. B) Molécules produites par <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6 seul sur un total de 44 pics.	160
Figure 38 : Répartition des molécules produites dans la co-culture <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> ; P.s. : molécules également retrouvées dans le surnageant de la monoculture de <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, A.o. : molécules également retrouvées dans le surnageant de la monoculture de <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, P.s. et A.o. : molécules retrouvées dans le surnageant des monocultures de <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, Co-culture : molécules présentes uniquement dans la co-culture.	161
Figure 39 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires produites dans la co-culture <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> et les monocultures <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 seules.....	162
Figure 40 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires dans la co-culture <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> : A) P.s. + A.o. : tous les pics considérés (46). B) Seuls les pics détectés uniquement dans la co-culture sont considérés (19).	163
Figure 41 : Répartition des molécules produites dans la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> ; S0162 : molécules présentes chez <i>Streptomyces</i> sp. S0162, A.o. : molécules présentes chez <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, S0162 et A.o. : molécules présentes chez <i>Streptomyces</i> sp. S0162 et chez <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, Co-culture : molécules présentes uniquement dans la co-culture.....	164

Figure 42 : Répartition des familles putatives de molécules produites dans la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> et les monocultures <i>Streptomyces</i> sp. S0162 et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 seules.....	165
Figure 43 : Répartition des familles putatives dans la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Aspergillus oryzae</i> : A) Tous les pics considérés (48). B) Seuls les pics détectés uniquement dans la co-culture sont considérés (20).....	166
Figure 44 : Répartition des molécules produites dans la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; S0162 : molécules présentes chez <i>Streptomyces</i> sp. S0162, C.c. : molécules présentes chez <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6, S0162 et C.c. : molécules présentes chez <i>Streptomyces</i> sp. S0162 et chez <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6, Co-culture : molécules présentes uniquement dans la co-culture.....	167
Figure 45 : Familles putatives des molécules produites dans la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i> et les monocultures <i>Streptomyces</i> sp. S0162 et <i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6 seules.	168
Figure 46 : Répartition des familles putatives dans la co-culture <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Cladosporium cladosporioides</i> : A) Tous les pics considérés (48). B) Seuls les pics détectés uniquement dans la co-culture sont considérés (25).....	169
Figure 47 : Nombre de hits peptidiques et protéiques en considérant : P.s. : le surnageant de monoculture de <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604, A.o. : le surnageant de monoculture de <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72, Co-culture : le surnageant de la co-culture P.s. + A.o., Co-culture <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i> , P.s. : les protéines et peptides sécrétés par <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 en co-culture, Co-culture A.o. : les protéines et peptides sécrétés par <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 en co-culture.	171
Figure 48 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les protéines et peptides synthétisés en monoculture par <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 (A) et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 (B) seules.	172
Figure 49 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les protéines et peptides synthétisés par la co-culture <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Aspergillus oryzae</i>	173
Figure 50 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les peptides et protéines identifiés comme étant synthétisés par <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 lorsqu'ils sont en co-culture.	174
Figure 51 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les peptides et protéines identifiés comme étant synthétisés par <i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604 et <i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72 uniquement dans la co-culture.....	176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Produits de biocontrôle autorisés en 2022 en France dans la lutte contre les fusarioses	27
Tableau 2 : Antifongiques commerciaux de biocontrôle dérivés de <i>Trichoderma</i> autorisés en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022). Seuls les produits phytopharmaceutiques de référence sont représentés.....	41
Tableau 3 : Antifongiques commerciaux de biocontrôle dérivés de <i>Bacillus</i> autorisés en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022). Seuls les produits phytopharmaceutiques de références et de seconde gamme (produit de référence mis sur le marché dans une autre gamme) sont représentés.	55
Tableau 4 : Antifongiques commerciaux de biocontrôle dérivés de <i>Pseudomonas</i> autorisés en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022).	59
Tableau 5 : Antifongique commercial de biocontrôle dérivé de <i>Streptomyces</i> autorisé en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022).	63
Tableau 6 : Les genres fongiques considérés après recherche bibliographique : genre <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> et <i>Pseudozyma</i>	74
Tableau 7 : Les genres bactériens considérés après recherche bibliographique : genres <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , et <i>Streptomyces</i>	77
Tableau 8 : Origine des souches utilisées dans la thèse.	87
Tableau 9 : Composition détaillée du milieu GMM (glucose minimum medium) utilisée dans cette étude.	89
Tableau 10 : Milieux sélectionnés après étude de la bibliographie : milieux standards LB, KB, MYM, GMM, PDB, milieu riche NB, et milieu minimum GMM modifié. Les milieux riche et minimum sont destinés à tous les microorganismes, et les milieux standards aux microorganismes correspondants.....	91
Tableau 11 : CMI de l'amphotéricine B déterminées pour <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 1333 et <i>Fusarium oxysporum</i> BR7 en milieu solide et liquide.....	102
Tableau 12 : Développement des co-cultures après 5 jours de culture dans les milieux LB et NB.	118

Tableau 13 : Taille du génome et taux de GC pour chaque microorganisme considéré :
Streptomyces sp. S0162, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Cladosporium cladosporioides*
PNF6..... 156

Tableau 14 : Nombres de hits liés aux différentes voies fonctionnelles pour *Pseudomonas syringae*
DSM 10604 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 en monoculture, en co-culture, ainsi que les
nouvelles sécrétions uniquement retrouvées en co-culture. 177

LISTE DES ABREVIATIONS

BCA	Biocontrol Agent (agent de biocontrôle)
DROM	Départements et région d'outre-mer
DMI	Fongicides Inhibiteurs de la déméthylation
MBC	Fongicides Méthyl, Benzimidazole, Carbamates
QoI	Fongicides Inhibiteurs externes de la quinone
SDHI	Fongicides Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase
DT ₅₀	Demi-vie
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
OSMAC	One Strain Many Compounds
MS	Chapitre 3 : matière sèche
ET	Ecart type
BGC	Biosynthetic Gene Cluster (cluster de gènes biosynthétiques)
GC	Bases G et C de l'ADN
RC	Cellulose régénérée
DO ₆₀₀	Densité optique à 600 nm

Organisme

ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
SFM	Société Française de Microbiologie
INRAE	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IBMA	Association internationale des entreprises de produits de biocontrôle
IEEP	Institute for European Environmental Policy

Microorganismes et co-cultures

Foc TR4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> Race Tropicale 4
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rhizobactérie favorisant la croissance des plantes)

AMF	Arbuscular mycorrhizal Fungi (champignon arbusculaire mycorhizien)
AF ⁻	Souche d' <i>Aspergillus flavus</i> non productrice d'aflatoxine
AF ⁺	Souche d' <i>Aspergillus flavus</i> productrice d'aflatoxine
LAB	Bactéries lactiques
P.s.	<i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604
S0162	<i>Streptomyces</i> sp. S0162
D.m.	<i>Dietzia</i> sp. DM01
P.a.	<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247
T.h.	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai MUCL 29707
A.o.	<i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72
C.c.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6
F.o.	<i>Fusarium oxysporum</i> BRRC7
P.s. + P.a.	Co-culture de <i>P. syringae</i> et <i>P. aphidis</i>
P.s. + A.o.	Co-culture de <i>P. syringae</i> et <i>A. oryzae</i>
P.s. + F.o.	Co-culture de <i>P. syringae</i> et <i>F. oxysporum</i>
D.m. + T.h.	Co-culture de <i>Dietzia</i> sp. et <i>T. harzianum</i>
S0162 + A.o.	Co-culture de <i>Streptomyces</i> sp. et <i>A. oryzae</i>
S0162 + C.c.	Co-culture de <i>Streptomyces</i> sp. et <i>C. cladosporioides</i>

Milieux

Les milieux utilisés dans le cadre de la thèse sont marqués en gras ; les autres milieux font partie de l'étude bibliographique uniquement.

LB	Milieu Lysogeny Broth
NB	Milieu Nutrient Broth
GMM	Milieu minimum Glucose (Glucose Minimum Medium)
KB	Milieu King's Broth
MYM	Milieu Maltose Extrait de levure Extrait de Malt
GYM	Milieu Glucose Extrait de levure Extrait de Malt
PDA/PDB	Milieu Extrait de Pomme de terre Dextrose avec/sans Agar
YMA/YM	Glucose Peptone Extrait de levure Extrait de malt avec/sans Agar
CYS80	Sucrose Semoule de Maïs Extrait de levure
SSM	Milieu standard succinate
YNB	Yeast Nitrogen Base (base de milieu minimum)
YPDA/YPD	Extrait de levure Peptone Dextrose avec/sans Agar
GPYB	Glucose Peptone Extrait de levure

CAS	Milieu Chrome Azurol S : détection de sidérophores
M9	Milieu minimum pour la culture de bactéries
TSBA	Gélose Tryptone Soja
GB	Glucose Peptone Extrait de bœuf Extrait de levure NaCl
LC	LB modifié (+ MgSO ₄ et Tris)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (milieu de culture cellulaire)
ISP-2 / ISP-3	Milieus spécifique aux Streptomyces
SCN/SCNA	Starch Casein Nitrate (Agar) (Milieu Amidon Caséine Nitrate)
M93	Glucose Extrait de levure Extrait de Malt Agar
YMG	Extrait de levure Malt Glucose
CCA	Agar chromogénique coliforme

Techniques

UV	UltraViolet
MEB	Microscopie électronique à balayage
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (analyse de protéines)
HPLC/UPLC	Chromatographie en phase liquide à haute/ultra performance
HPTLC	Chromatographie sur couche mince haute performance
RPLC	Chromatographie liquide à polarité de phase inversée
PDA	Photodiode Array Detection (Détecteur à barrette de diode)
MS	Spectrométrie de masse
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
Q-TOF	Spectrométrie de masse en tandem quadripôle-temps de vol
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (désorption-ionisation laser assistée par matrice) – utilisée en spectrométrie de masse
SPME/HS-SPME	Microextraction sur phase solide/ dans l'espace de tête (headspace)
RMN/ ¹ H-RMN	Résonance Magnétique Nucléaire (de Proton)
RT-(q)PCR	Transcription Inverse - Réaction en Chaîne par Polymerase (quantitative)
FSC	Forward Scatter – lumière diffusée aux petits angles (cytométrie en flux)
SSC	Side Scatter – lumière diffusée à 90 degrés (cytométrie en flux)

Molécules

DON	Déoxynivalénol
-----	----------------

6PP	6-pentyl- α -pyrone
NRP	Peptide non ribosomique
NRPS	Synthétase de peptide non ribosomique
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
COV	Composé organique volatil
BTEX	Benzène Toluène Ethylbenzène Xylènes
PCN	Phenazine-1-carboxamide
PCA	Acide phenazine-1-carboxylique
PLA	Acide phényllactique
AmB	Amphotéricine B
PTM	Tétramate polycyclique macrolactame
RiPP	Peptides synthétisés par la voie ribosomique et modifiés post- traduction
NAGGN	N-acetylglutaminyglutamine amide
IP	iodure de propidium
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
SSA	Acide sulfosalicylique
ACN	Acétonitrile
TFA	Acide trifluoroacétique

INTRODUCTION GENERALE

Les champignons et oomycètes phytopathogènes causent des maladies touchant tous types de plantes cultivées, provoquant des pertes de rendement pouvant aller de la perte de qualité de ce qui est récolté (aliment propre à la consommation mais aspect, goût ou forme modifiés ce qui peut déplaire au consommateur), la quasi disparition de cultivars (Bananes Gros Michel et *Fusarium oxysporum*) (Ploetz 2015), jusqu'à la famine – mildiou de la pomme de terre (Yoshida et al. 2013) ou au risque sanitaire avec par exemple l'ergotisme – ou feu de saint Antoine – causé par des mycotoxines de *Claviceps purpurea* (van Dongen, de Groot 1995).

Les formes de lutte existantes contre ces pathogènes sont historiquement minérales (soufre, bouille bordelaise), ou impliquent l'utilisation de moyens biologiques *stricto sensu*, comme par exemple l'ail. Grâce au développement de la chimie de synthèse, de nouvelles molécules antifongiques ont vu le jour, permettant ainsi de lutter à plus grande échelle contre les phytopathogènes avec une action préventive voire curative (Thomson 1973).

Avec le changement climatique, la modification de l'incidence des maladies fongiques en particulier est inéluctable (Newton et al. 2011). De plus, l'apparition de résistances aux traitements phytosanitaires de plus en plus fréquente soulève la question de l'efficacité et de la durabilité des traitements présentement utilisés (Ishii 2006). Il est donc devenu absolument nécessaire de trouver des moyens de lutte soutenables contre ces maladies. La prise de conscience des conséquences désastreuses de l'utilisation abusive de pesticides chimiques, sur l'environnement tout comme sur la santé des agriculteurs et des consommateurs (Smalling et al. 2013; Zarn et al. 2003) amène à la considération de solutions trouvées dans la nature ou inspirées par celle-ci, comme le biocontrôle.

Défini comme « un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels » (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire, France), le biocontrôle est considéré comme une solution à poursuivre dans le cadre de nombreux projets de substitution de produits phytosanitaires de synthèse comme le Plan Ecophyto 2022 et à une plus grande échelle le Pacte Vert de l'Union Européenne. Différents produits peuvent être envisagés dans une approche de lutte contre des nuisibles via le biocontrôle : les macroorganismes et les produits phytopharmaceutiques utilisant des mécanismes naturels. Parmi ces derniers se comptent notamment des microorganismes, qui peuvent être utilisés soit directement contre les ravageurs soit par l'intermédiaire des métabolites secondaires qu'ils produisent (Whipps 2001).

Cependant, bien que les microorganismes possèdent la capacité de synthétiser un large panel de molécules dont l'activité est intéressante (Xu et al. 2019), le potentiel de production n'est pas nécessairement retrouvé *in vitro*. Ceci rend encore plus complexe la lutte contre les phytopathogènes.

Aussi, il existe des solutions permettant d'induire la production de molécules particulières, en mettant les microorganismes dans des conditions particulières : c'est le cas de la méthode OSMAC (One Strain Many Compounds), permettant de tester plusieurs conditions de culture pour une même souche. Parmi ces conditions, la co-culture, mettant en présence deux ou plusieurs populations de cellules, est un moyen intéressant d'induire la production de molécules qui ne serait pas possible (Goers et al. 2014). En effet, elle permet de recréer des interactions existantes dans la nature, où les microorganismes n'existent jamais seuls. Grâce à ces interactions, le profil métabolique des microorganismes ainsi mis en présence des uns et des autres peut se trouver modifié.

Plus particulièrement, les co-cultures impliquant des microorganismes appartenant à des règnes différents suscitent un intérêt croissant. Ceci est retrouvé pour les co-cultures bactérie-champignon, qui permettent notamment d'induire la production de molécules à activité antifongique (Li et al. 2020).

C'est dans ce contexte que ce projet de thèse s'est développé. Il s'est déroulé à l'UMR Transfrontalière BioEcoAgro à l'Université de Lille et à l'URD ABI (Unité de Recherche et Développement Agro-Biotechnologies Industrielles) au CEBB (Centre Européen de Biotechnologies et Bioéconomie). Le projet réunit également, en conseil scientifique, le Groupe Soufflet et l'UTC (Université de Technologie de Compiègne). Ces différentes institutions ont réuni leur expertise afin de mener à bien ce projet de thèse.

L'objectif de cette thèse a été de sélectionner des microorganismes connus pour leur activité antifongique potentielle, de cribler leur activité puis sélectionner les co-cultures les plus performantes et identifier les métabolites produits. Le déroulement de ce projet de thèse est décrit dans la figure Figure 1.

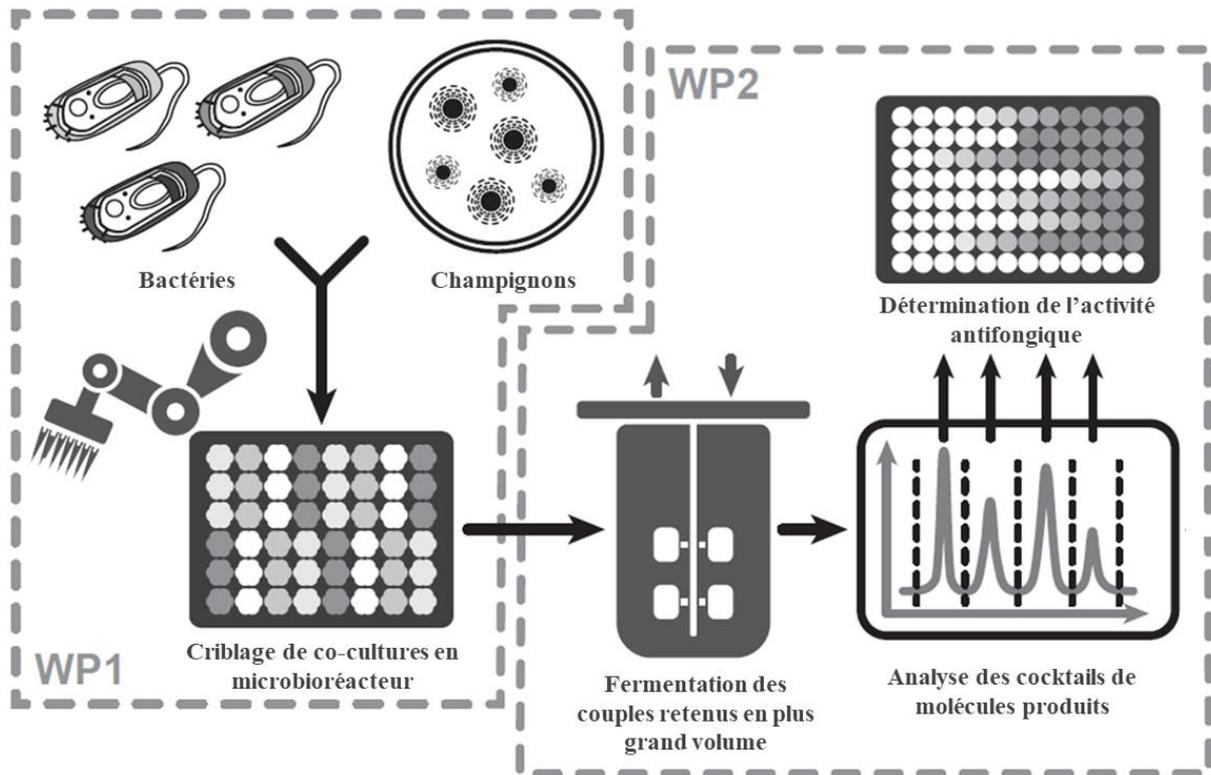


Figure 1 : Schéma représentant les deux grandes parties du projet de thèse : criblage d'activités antifongiques des co-cultures en microbioréacteur après sélection de microorganismes (WP1), puis fermentations en plus grand volume des couples retenus pour une analyse de leurs sécrétions métaboliques dans une optique de détermination d'activité antifongique (WP2).

Ce manuscrit reprend les travaux de thèse qui ont été réalisés, dans cinq chapitres ; tout d'abord, le premier chapitre permettra de resituer le contexte dans lequel s'inscrit ce projet de thèse, des impacts des maladies à *Fusarium* à plusieurs niveaux, aux solutions existantes pour lutter contre ces pathologies, et les pistes de solutions recherchées dans ce projet. Le deuxième chapitre portera sur le choix des microorganismes sélectionnés pour la réalisation de co-cultures. Le troisième chapitre sera focalisé sur le criblage des co-cultures pour leur activité antifongique. Le quatrième chapitre s'intéressera aux productions de ces co-cultures. Enfin, le dernier chapitre conclura sur l'ensemble des travaux de la thèse et dégagera des perspectives pouvant être considérées pour la poursuite de ce travail.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans un monde où nourrir les Hommes est une problématique toujours plus prenante, la lutte contre les maladies qui touchent les plantes cultivées, afin d'éviter les pertes de rendement, la baisse de qualité des récoltes et de permettre une meilleure conservation des aliments, est un point crucial dans l'agriculture. Les maladies des plantes peuvent être causées par des facteurs abiotiques, tels que la température, la salinité ou le pH de l'environnement, l'humidité, et par des facteurs biotiques, comme des ravageurs macroscopiques (insectes, nématodes, ...) et microscopiques (bactéries, champignons et virus). Différentes méthodes de lutte ont été mises en place afin de parer à ces pathologies. Ces moyens de lutte peuvent aller des solutions naturelles à la chimie de synthèse, permettant un ciblage en masse de ces maladies. Cependant, les moyens de lutte chimique présentent plusieurs problèmes, notamment pour l'environnement. Des phénomènes de résistance peuvent également apparaître. Pour introduire des méthodes de lutte plus durables, le biocontrôle, impliquant des mécanismes et des molécules naturelles suscite un grand intérêt. Récemment, des recherches ont visé à reproduire *in vitro* les phénomènes de compétition existants au sein des écosystèmes naturels. L'objectif est de développer des solutions de biocontrôle au travers des interactions entre différents agents de biocontrôle (BCA).

Ce chapitre présentera un état de l'art sur les phytopathologies fongiques, en particulier celles provoquées par *F. graminearum* et *F. oxysporum*, ainsi que les solutions chimiques existantes pour lutter contre ces dernières. Puis l'on s'intéressera à l'usage du biocontrôle comme alternative aux solutions chimiques, et en particulier la production de biomolécules par des co-cultures. Enfin, les microorganismes considérés dans la partie expérimentale de cette thèse seront présentés, et leur mise en co-culture sera discutée.

1. Maladies fongiques

Les maladies fongiques désignent des maladies causées par des microorganismes appartenant au règne des *Fungi*, et au sens plus large incluant la classe des oomycètes (règne : *Chromista*). Les phytopathologies fongiques affectent plusieurs espèces de plantes et causent de nombreuses pertes de rendement, impactent la qualité organoleptique des plantes récoltées et peuvent éventuellement avoir un effet néfaste sur la santé des consommateurs à cause notamment de la production de mycotoxines (Placinta et al. 1999). Ces maladies peuvent toucher tous les organes des plantes, des racines jusqu'aux fruits, ainsi que la tige et les feuilles. Les pertes induites par ces pathologies sont conséquentes puisqu'environ un tiers des pertes avant et après récolte est causé par les pathogènes fongiques (Fisher et al. 2012). Parmi ces pathogènes, ceux appartenant au genre *Fusarium* représentent une importance économique et écologique notable (Ma et al. 2013).

1.1 Exemple de maladies fongiques : focus sur *Fusarium*

Le genre *Fusarium* regroupe un très grand nombre d'espèces appartenant à la famille des *Nectriaceae* dans la division des ascomycètes. Ce genre est très ancien ; il peut être considéré comme étant présent sur la planète depuis plusieurs dizaines de millions d'années selon le référentiel de groupe taxonomique choisi (Summerell et al. 2010). Ceci explique l'aspect ubiquiste de la présence de *Fusarium* sur Terre. Il se retrouve dans des habitats et des conditions climatiques variés jusque dans les régions désertiques, alpines et arctiques (Nelson et al. 1994).

La classification taxonomique des espèces de *Fusarium* est complexe, et s'est historiquement effectuée sur la base d'observations visuelles (comme l'aspect des spores : macroconidies en forme de faucille). Le genre *Fusarium* a d'abord été classé principalement sur des critères de morphologie ; cependant, à partir des années 1990, cette classification a inclus d'avantage des concepts de biologie (impliquant une reproduction sexuée) et phylogénétique (particulièrement intéressant pour des espèces ne produisant pas systématiquement un stade sexuel) (Summerell et al. 2010). Avec les progrès de la biologie, la systématique moléculaire a également permis de mieux comprendre la diversité et les relations phylétiques de *Fusarium* (Geiser et al. 2013). *Fusarium* comprend environ 300 espèces phylogénétiquement différentes. Beaucoup d'espèces de *Fusarium* suivent un mode de vie hémibiotrophe, c'est-à-dire qu'elles se développent au sein d'un organisme vivant, et, en causant sa mort, se nourrissent des tissus morts. Cela se traduit par l'apparition de pourriture, flétrissement, chancre ou de rouille (Pradhan et al. 2020). Par

conséquent, les maladies causées par ce champignon ont un impact conséquent sur les végétaux cibles.

Les espèces de *Fusarium* sont ainsi regroupées au sein de complexes d'espèces au nombre de dix (SFM – Société Française de Microbiologie). Parmi ces complexes, quatre sont phytopathogènes : *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. solani* et *F. oxysporum* (Aoki et al. 2014). Le complexe *Fusarium fujikuroi* est à l'origine de plusieurs maladies comme la bakanae du riz et la fusariose des épis de maïs. En outre, ce complexe phytopathogène produit des mycotoxines (les fumonisines). Le complexe *Fusarium solani* cause des pourritures de la racine et du pied chez de diverses plantes. Les complexes *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* ont été classés parmi les phytopathogènes fongiques les plus importants (Dean et al. 2012). Ils provoquent respectivement la fusariose du blé et de l'orge, et la fusariose vasculaire sur un grand nombre de plantes. A l'image de *Fusarium fujikuroi*, le complexe *Fusarium graminearum* produit des mycotoxines, des trichothécènes.

Si l'on s'intéresse à la fusariose du blé causée par le complexe *Fusarium graminearum*, dont le cycle de vie est décrit dans la figure 2, il apparaît que ce complexe phytopathogène produit des mycotoxines, dont la zéaralénone et les trichothécènes, nivalénol et déoxynivalénol (DON) (Schisler et al. 2002; Chen et al. 2020). Le DON est la mycotoxine la plus détectée dans les céréales, avec un taux d'occurrence de 59 % en moyenne (Lee, Ryu 2017). Il est connu pour être un facteur de virulence essentiel ainsi lorsque sa biosynthèse est supprimée, la virulence de *F. graminearum* est réduite (Proctor et al. 1995). Il existe d'autres formes de fusariose : *Microdochium* spp. – qui ne produit pas de mycotoxines – et *Fusarium culmorum* (Walter et al., 2010). Il est également intéressant de noter que *F. graminearum* est biologiquement très différent de la plupart des autres espèces du genre *Fusarium*. En effet, lors de sa reproduction sexuée, les gamètes proviennent du même organisme, faisant de *F. graminearum* une espèce homothallique. Les ascospores ainsi générées sont dispersées dans l'air, ce qui induit une diffusion de la fusariose aux cultures (Summerell et al. 2010). *F. graminearum* produit également un grand nombre de spores asexuées, des conidies, dont la dispersion est liée aux éclaboussures causées par la pluie (Figure 2).

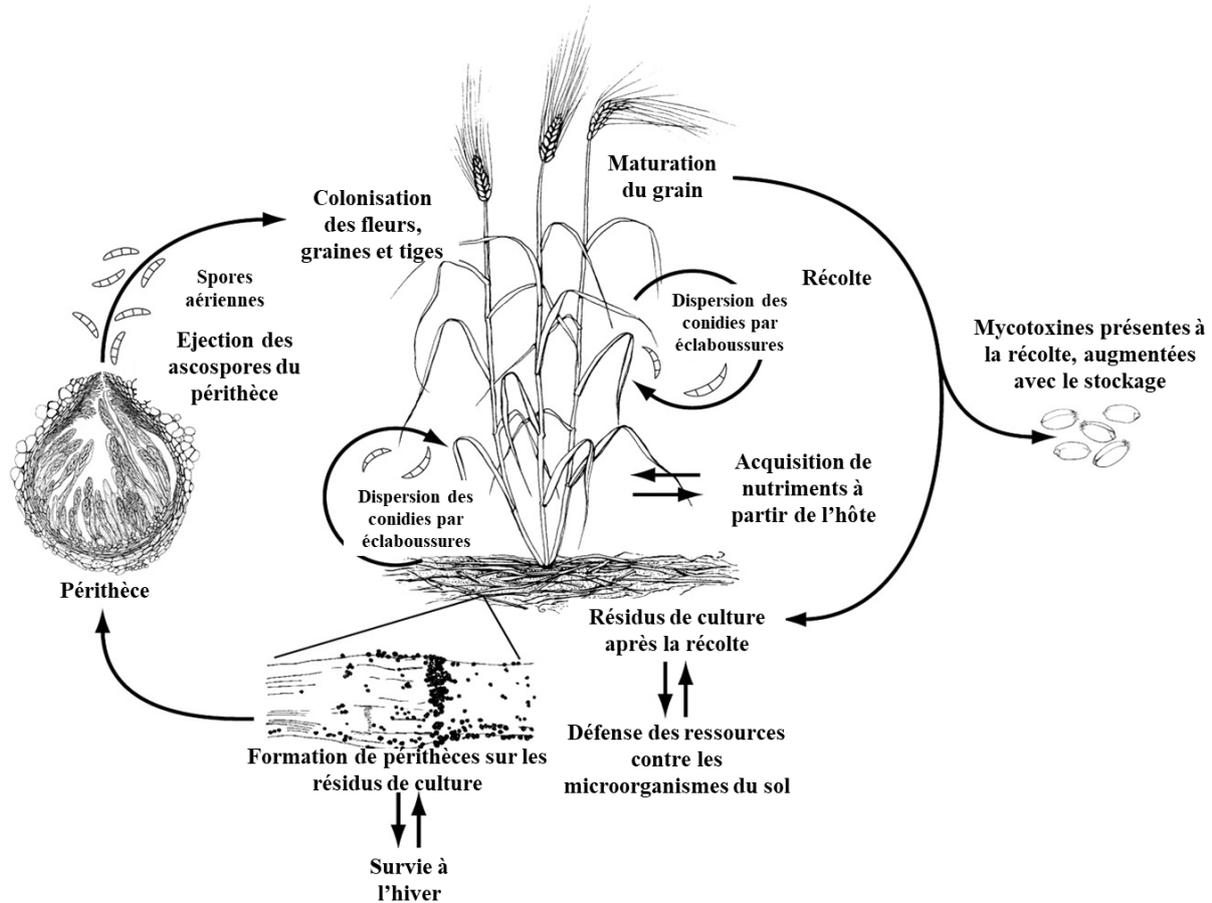


Figure 2 : Cycle de vie de *Fusarium graminearum* au champ – phase sexuelle, *Gibberella zeae* (adapté de Trail, 2009).

Quant au complexe *Fusarium oxysporum*, il regroupe plus de 100 *formae speciales*. Il est le taxon le plus important en agronomie par son impact économique et par sa distribution mondiale ainsi que le nombre d'espèces végétales pouvant être touchées par ces pathogènes (Booth 1971). Un exemple connu de ce complexe est *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, qui cause la fusariose de la banane (Ploetz 2006). *F. oxysporum* peut également atteindre le lin (Olivain et al. 2003), le coton (Assigbetse et al. 1994), ou d'autres fruits que la banane, comme la pastèque (Everts, Himmelstein 2015). *F. oxysporum* étant un pathogène vasculaire, il est particulièrement difficile de lutter contre lui en utilisant des antagonistes microbiens. Son cycle de vie est différent de celui de *F. graminearum* : l'infection de l'hôte commence après la germination de spores asexuées (chlamydospores) de *F. oxysporum*, dont le tube de germination peut entrer en contact avec les racines. Si la pénétration de la racine par les appressoria du champignon est possible, la colonisation du cortex racinaire commence. Le champignon acquiert des nutriments à partir de l'hôte, à l'image de *F. graminearum* (Figure 2). Il se propage dans toute la plante en pénétrant le xylème et en se développant dans le système vasculaire végétal. *F. oxysporum* peut

lui aussi survivre dans le sol sous forme de spores asexuées durant de nombreuses années, perpétuant le cycle de l'infection après l'hiver (Gordon 2017).

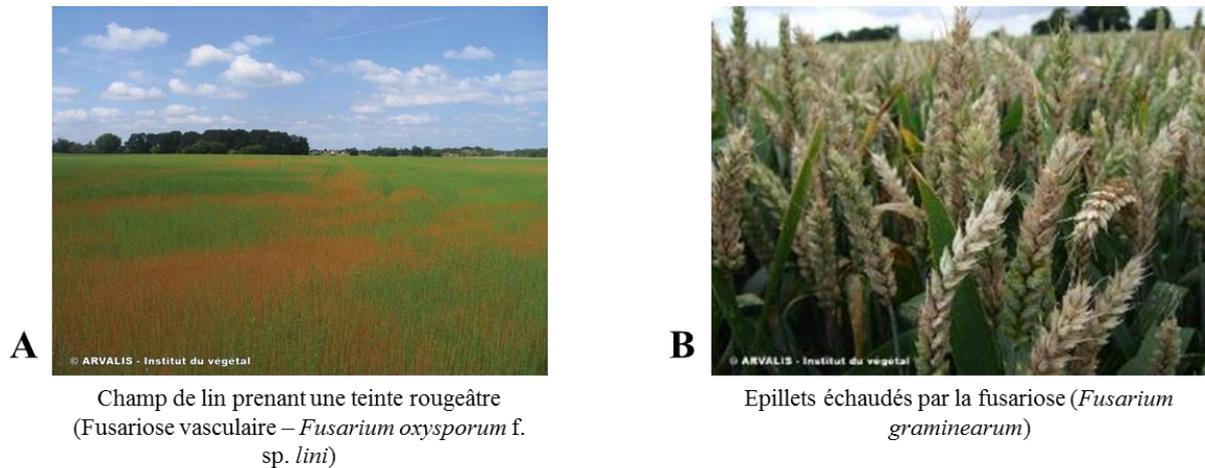


Figure 3 : Symptômes au champ engendrés par des maladies causées par *Fusarium* : la fusariose vasculaire du lin (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) (A), et la fusariose du blé (*Fusarium graminearum*) (B) – Photos issues de l’institut du végétal ARVALIS.

Plusieurs facteurs favorisent l’apparition de fusarioses, comme une forte humidité, des températures plus chaudes (par exemple 25 °C pour *F. graminearum*), des résidus de culture contaminés et la sensibilité des variétés cultivées (ARVALIS ; Parry et al. 1995). Les symptômes de la fusariose du blé causée par *F. graminearum* se présentent sous la forme d’épillets de blé échaudés, de couleur rose orange, et d’un éventuel brunissement du col de l’épi (ARVALIS). La fusariose du blé cause ainsi la production de grains de moins bonne qualité et diminués en masse, mais aussi la stérilisation éventuelle des épillets (Trail 2009). Les symptômes des maladies causées par *F. oxysporum* sont de façon générale un jaunissement et flétrissement des feuilles, et une nécrose du système vasculaire avec l’apparition d’une coloration rose-rouge ou marron à ce niveau (Olivain, Alabouvette 1999).

1.2 Impacts de *Fusarium* (économique, organoleptique, sanitaire)

Au travers d’une étude de la liste des maladies touchant les plantes de la Société Américaine de Phytopathologie (American Phytopathological Society), il a été montré que 81 des 101 plantes les plus importantes économiquement ont au moins une maladie associée causée par un *Fusarium* (Leslie, Summerell 2008). En particulier, *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* sont considérés comme étant parmi les champignons phytopathogènes dont la diffusion provoque le plus de conséquences économiques sur les cultures, parmi d’autres pathogènes comme *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia* spp., *Blumeria graminis*,

Mycosphaerella graminicola (anamorphe *Septoria tritici*), *Colletotrichum* spp., *Ustilago maydis* ou *Melampsora lini* (Dean et al. 2012).

En France, la fusariose du blé peut représenter des pertes qui dépassent les 20 quintaux/ha (ARVALIS). En plus des pertes de rendement, la fusariose du blé impacte négativement la qualité des céréales récoltées à cause de la sécrétion de mycotoxines par le champignon phytopathogène. La principale mycotoxine est le DON produit par *Fusarium graminearum* ainsi que *Fusarium culmorum*. Cette mycotoxine est à l'origine de toxicoses chez les animaux (notamment le porc) qui se traduisent par la diminution de la prise de poids, une perte d'appétence, un effet émétique et une immunotoxicité qui peuvent conduire à la mort de l'animal (Pestka 2007). Le DON représente également un risque non négligeable pour la santé humaine (Mishra et al. 2020).

Bien qu'il ne produise pas de mycotoxines, *F. oxysporum* provoque des pertes dans de nombreuses productions agricoles. C'est pourquoi, certaines de ces maladies font l'objet d'une surveillance accrue, comme celles touchant la banane. Historiquement, *F. oxysporum* a eu des conséquences désastreuses pour l'industrie de la banane dans les années 1980, dont la résolution n'a été possible que par la culture majoritaire d'un cultivar résistant, la banane Cavendish (Ploetz 2015). Plus récemment, un rapport d'expertise collective de l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire alimentation, environnement, travail) portant sur le risque phytosanitaire représenté par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dans les départements d'outre-mer considère cet agent pathogène comme « constituant un danger important pour la production de banane dans [les DROM] » (Tassus et al. 2018).

2. Moyens de lutte conventionnels : Pesticides de synthèse

La lutte contre tout type de phytopathogènes, notamment fongiques, requiert une bonne connaissance de la culture ; en effet, la prévention de l'infection des cultures par des pathogènes commence par de bonnes pratiques agricoles, comme la rotation des cultures, le labour, la modification des dates de semis et de récolte, la gestion des repousses et la destruction des résidus de culture, dans le but de détruire les spores ou les restes de mycélium au champ. Dans le choix des variétés, il s'agit également de sélectionner des variétés moins sensibles voire résistantes aux maladies et de diversifier les variétés plantées sur un même territoire (Shah et al. 2018). En outre, il est possible d'endiguer la progression de la maladie en jouant sur la densité de culture ou la fréquence de fertilisation des sols, notamment en modulant l'apport en azote (INRAE, ANSES, ARVALIS 2022).

Aussi, le traitement d'une culture ne doit être considéré que s'il est nécessaire. La stratégie phytosanitaire doit prendre en compte différents paramètres de culture comme la capacité de résistance de la variété végétale, le climat, les conditions de culture, les observations au champ, l'impact économique et le rendement à obtenir, le type de fongicide, la fréquence et la période d'application (Dweba et al. 2017). Dans la lutte contre les maladies causées par *Fusarium*, plusieurs méthodes existent, telles que la désinfection du sol par fumigation avec de la chloropicrine, de l'eau chaude ou par solarisation ainsi que l'ensemencement de cultivars résistants (Arie 2019).

2.1 Fongicides utilisés contre les maladies cryptogames : le cas de *Fusarium*

2.1.1 Fongicides utilisés contre *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum*

Il existe une grande diversité de fongicides, dont les modes d'action variés permettent des utilisations ciblées contre un grand nombre de pathogènes fongiques. Souvent, ces fongicides présentent l'avantage d'être accessibles à des prix raisonnables pour les agriculteurs (Bethke, Cloyd 2009).

Dans la lutte contre les fusarioses des céréales, dont *F. graminearum* est un des agents pathogènes, les molécules les plus utilisées appartiennent à la famille des triazoles. Les plus usités sont le prothioconazole ainsi que le tébuconazole, le metconazole ou le bromuconazole, qui sont des inhibiteurs de la déméthylation ou DMI. Le prochloraze, un imidazole également DMI, peut être également épandu sur les céréales. D'autres fongicides peuvent être utilisés, comme des fongicides MBC (Methyl Benzimidazole Carbamates) ou des QoI (inhibiteurs externes de la quinone). Dans la lutte contre *F. oxysporum*, les fongicides utilisés appartiennent

généralement aux familles utilisées contre *F. graminearum*, dans le cas où l'on observe une efficacité (Jahanshir, Fevzi 2010).

Contre certaines formes pathogènes de *F. oxysporum*, comme *F. oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 aucun traitement fongicide n'est pour le moment disponible (Tassus et al. 2018). Cet état de fait oblige l'exploitant agricole à réaliser des traitements préventifs et se concentrer sur des pratiques agricoles maîtrisées, et demande un contrôle des imports et exports de matériel végétal afin d'endiguer la progression de la maladie sur des territoires sains. Ces traitements demeurent préventifs : en effet, après apparition des premiers symptômes au champ, il est trop tard pour appliquer des fongicides.

2.1.2 Mode d'action des fongicides chimiques

Les antifongiques peuvent avoir différents modes d'action ou cibles : réduction de la production d'énergie cellulaire (impact sur les processus respiratoires comme le font les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase ou SDHI), inhibition de la biosynthèse de composants majeurs tels que ceux impliqués dans la formation de la paroi cellulaire (les glucides - chitine, les lipides - phospholipides, les stérols, les protéines, les acides nucléiques) ou perturbation de la formation et/ou du fonctionnement des microtubules (Leroux 2003). Ainsi, les cibles des composés antifongiques sont, par exemple, la synthèse des ergostérols, de la chitine, la synthèse de glucane, de la squalène époxydase (monooxygénase) et la synthèse des acides nucléiques, des protéines et des microtubules (Kathiravan et al. 2012).

Dans le cas de la lutte contre *Fusarium*, les familles de molécules phytosanitaires les plus utilisées sont les DMI qui sont des inhibiteurs de la déméthylation en C14 dans la biosynthèse du stérol (DMI, DeMethylation Inhibitors) perturbant ainsi la formation de la paroi du champignon. Les MBC (Methyl Benzimidazole Carbamates) sont également retrouvés : ils impactent le cytosquelette via la perturbation de la polymérisation de la tubuline ainsi que les molécules de la famille des QoI, qui empêchent le pathogène de produire de l'énergie.

2.2 Limites des pesticides

L'apparition de résistances et l'impact des pesticides chimiques sur la santé humaine et/ou l'environnement ont conduit à un nombre croissant d'interdictions concernant leur utilisation. Dans le cas de la lutte contre la fusariose, il apparaît que la majorité des fongicides existants ont été retirés ou que leur utilisation a été restreinte.

D'après le catalogue des produits phytopharmaceutiques autorisés en France (E-Phy, ANSES), en recherchant le mot clé fusariose dans les produits phytosanitaires, 196 produits autorisés se

trouvent dans la catégorie des fongicides en janvier 2021 alors que 152 ont été complètement retirés. En septembre 2022, 202 produits sont autorisés contre 272 références retirées. Il convient de noter que l'usage de certains fongicides toujours autorisés a été restreint à quelques usages choisis, ce qui se traduit par des fongicides partiellement retirés.

Les solutions existantes pour limiter les effets ou éradiquer les maladies causées par *Fusarium* restent limitées, surtout dans le cadre des restrictions croissantes envers les produits phytosanitaires, en raison des effets désastreux sur l'environnement et la santé des utilisateurs ou même des consommateurs (Tschardt et al. 2012).

2.2.1 Résistance

La résistance aux fongicides chimiques n'est pas un problème nouveau : elle a émergé dans les années 1970, alors que les premiers fongicides de synthèse avaient été introduits dans les années 1930 avec les dithiocarbamates (Torgeson 1967). Celle-ci concernait alors des fongicides agissant sur une seule cible moléculaire, pour lesquels la résistance apparaît rapidement à cause d'usages déraisonnés. C'est le cas par exemple des benzimidazoles, utilisés comme fongicides principaux contre *B. cinerea* dans les années 1960 (Hahn 2014). Les problèmes de résistance fongique apparaissent lors de l'utilisation excessive d'une seule molécule ou famille de molécules avec le même mode d'action contre une maladie fongique, aussi une façon de lutter contre ce phénomène peut être l'utilisation de fongicides multisites.

Cependant, d'autres modes de résistance peuvent exister, et consistent en un processus de détoxification du fongicide par le champignon phytopathogène. Ce phénomène est à l'origine de résistances multiples, qu'il est difficile d'endiguer (Rupp et al. 2017). Pour prévenir les phénomènes de résistance, les bonnes pratiques de culture décrites précédemment sont toujours préconisées et la diminution de la fréquence voire l'arrêt du traitement sont recommandés. Cependant, lorsque la résistance est installée, les génotypes résistants subsistent dans les cultures longtemps après l'arrêt du traitement avec le fongicide concerné (Walker et al. 2013).

L'efficacité des molécules utilisées pour le traitement de la fusariose, dont l'utilisation reste toujours possible, est cependant beaucoup plus aléatoire qu'auparavant. Les différentes espèces de *Fusarium* présentent des résistances à de nombreuses familles de fongicides qui sont utilisées couramment comme par exemple les inhibiteurs de la déméthylation (DMI) (Yin et al. 2009) et les benzimidazoles (MBC) (Magie, Wilfret 1974).

2.2.2 Impact sur l'environnement

Les impacts des pesticides de synthèse sur l'environnement ne sont pas cantonnés aux cibles de ces derniers. En effet, avec une demi-vie (DT_{50}) de l'ordre de plusieurs dizaines de jours, et une bioaccumulation de ces molécules dans l'environnement (eau, sols) et dans les organismes vivants, les pesticides chimiques peuvent se retrouver dans tous les écosystèmes. Le carbendazime, par exemple, a un DT_{50} dans les sols de 6 à 12 mois selon les conditions, mais se dissipe relativement rapidement dans l'eau (DT_{50} de 2 à 25 jours) (Singh et al. 2016). Aussi, des traces de produits interdits ou non utilisés depuis plusieurs années peuvent se retrouver dans des sols ou cours d'eau à proximité de terres agricoles.

Du fait de cette rémanence, les pesticides peuvent avoir des effets néfastes sur les populations de ces différents habitats, comme le déséquilibre de la microflore édaphique – relative au sol, avec des pertes de diversité au sein des sols traités par ces molécules (Wang et al. 2012), mais aussi des modifications d'activité de microorganismes bénéfiques aux plantes (Niewiadomska 2004) et des effets négatifs sur le rendement de la plante traitée par les pesticides. Des traces de pesticides sont également observées dans la macrofaune et la flore (Smalling et al. 2013). Les effets toxiques des fongicides sont connus et détaillés pour de nombreux animaux, aquatiques (Andrade et al. 2016) comme terrestres (Aire 2005). En outre, les effets délétères des fongicides sur les sols (dégradation des propriétés biologiques et perte de rendement) ont été également décrits (Baćmaga et al. 2019).

En mai 2022, une étude d'INRAE et de l'Ifremer sur l'impact des pesticides sur la biodiversité et les services rendus par la nature (écosystémiques) a été rendue publique (INRAE, Ifremer 2022). Des effets non attendus et n'étant pas en relation avec le mode d'action connu des pesticides considérés sont de plus en plus présents, touchant donc un plus large panel d'espèces (notamment via des perturbations du système nerveux, immunitaire, endocrinien, ou des interactions avec les microbiotes). Il existe également des effets indirects des produits phytosanitaires, parmi lesquels la réduction de ressources alimentaires après application entre autres de fongicides qui ont des propriétés insecticides pour les insectivores, la perte d'habitats (application d'herbicides sur la végétation), les variations de l'intensité de prédation ou de compétition vis-à-vis de la ressource alimentaire.

2.2.3 Impacts sur la santé humaine

Les pesticides chimiques peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine : d'une part, directement lors de l'application au champ, et d'autre part, indirectement lors de la consommation de produits traités, les pesticides chimiques se retrouvant dans la chaîne

alimentaire (Stensvand et al. 2000; Calhelha et al. 2006; González-Rodríguez et al. 2008). Certains fongicides présentent des activités inhibitrices chez les mammifères, par exemple interférant avec la stéroïdogénèse (Zarn et al. 2003), et pourraient être perturbateurs endocriniens, perturber l'embryogénèse (Chambers et al. 2014), et être des facteurs de risque de cancers, notamment des voies aéro-digestives (Brasil et al. 2018).

Les risques pouvant être attribués aux fongicides demeurent une question pressante et d'actualité. Un rapport de l'Inserm datant de 2021, portant sur les pesticides et leurs effets sur la santé, montre que l'utilisation généralisée des pesticides pour la protection des cultures soulève plusieurs questions quant à leurs effets sur la santé humaine (Inserm 2021). Cependant, pour de nombreuses familles de pesticides, il est difficile d'établir des liens clairs entre certaines pathologies et une exposition aux pesticides, notamment par manque de données épidémiologiques – c'est le cas notamment avec les effets négatifs des SDHI observés chez les animaux mais pas chez l'Homme. Les différents risques décrits ou présumés de l'usage des produits phytosanitaires sur la santé humaine influencent fortement l'opinion publique. Cet état de fait a amené les pouvoirs publics à reconsidérer et contrôler plus étroitement l'usage en agriculture des phytosanitaires pour le traitement des maladies des plantes.

La mise en place de réglementations en France et en Europe a découlé de toutes ces limites afin de mieux régir l'utilisation des pesticides de synthèse, et ce depuis les années 1990, allant jusqu'à l'interdiction des produits présentant le plus de risques. En parallèle, l'intérêt pour de nouvelles solutions alternatives s'est développé ces dernières décennies ; certaines existent déjà ou doivent être développées, afin de les substituer partiellement ou totalement aux produits phytosanitaires de synthèse.

3. Une solution alternative aux fongicides de synthèse : le Biocontrôle

Dans l'optique de pratiquer une agriculture plus respectueuse de l'environnement, des écosystèmes et de parer aux risques éventuels sur la santé humaine, animale et végétale, plusieurs mesures et plans ont été élaborés. Une des solutions alternatives aux pesticides de synthèse est l'utilisation de produits de biocontrôle (contraction de l'anglais « Biological control »). Par conséquent, les produits trouvés dans la nature et surtout issus d'organismes vivants - par opposition à ceux synthétisés par la chimie - suscitent un intérêt croissant pour lutter contre les fusarioses.

Les techniques de biocontrôle, bien que le terme tel quel soit relativement récent, sont ancestrales, avec par exemple l'utilisation d'ail (Shang et al. 2019; Hayat et al. 2016) ou de prêle des champs (Garcia et al. 2012) comme moyen de lutte contre des pathogènes fongiques. Les exemples de lutte biologique dans des ouvrages scientifiques datent quant à eux de la fin du 19^e et du début du 20^e siècle.

Le marché du biocontrôle bénéficie d'une croissance régulière et continue depuis les années 2000. En 2021, d'après l'IBMA (International Biocontrol Manufacturers Association), il représente 13 % de la vente des produits de lutte contre les pathogènes en France, contre 8 % en 2018 et a connu une hausse de 16 % entre 2020 et 2021, atteignant un chiffre d'affaire de 274 millions d'euros. Les fongicides représentent en outre 19,5 % du marché du biocontrôle en 2021, contre 13 % l'année précédente (Figure 4).

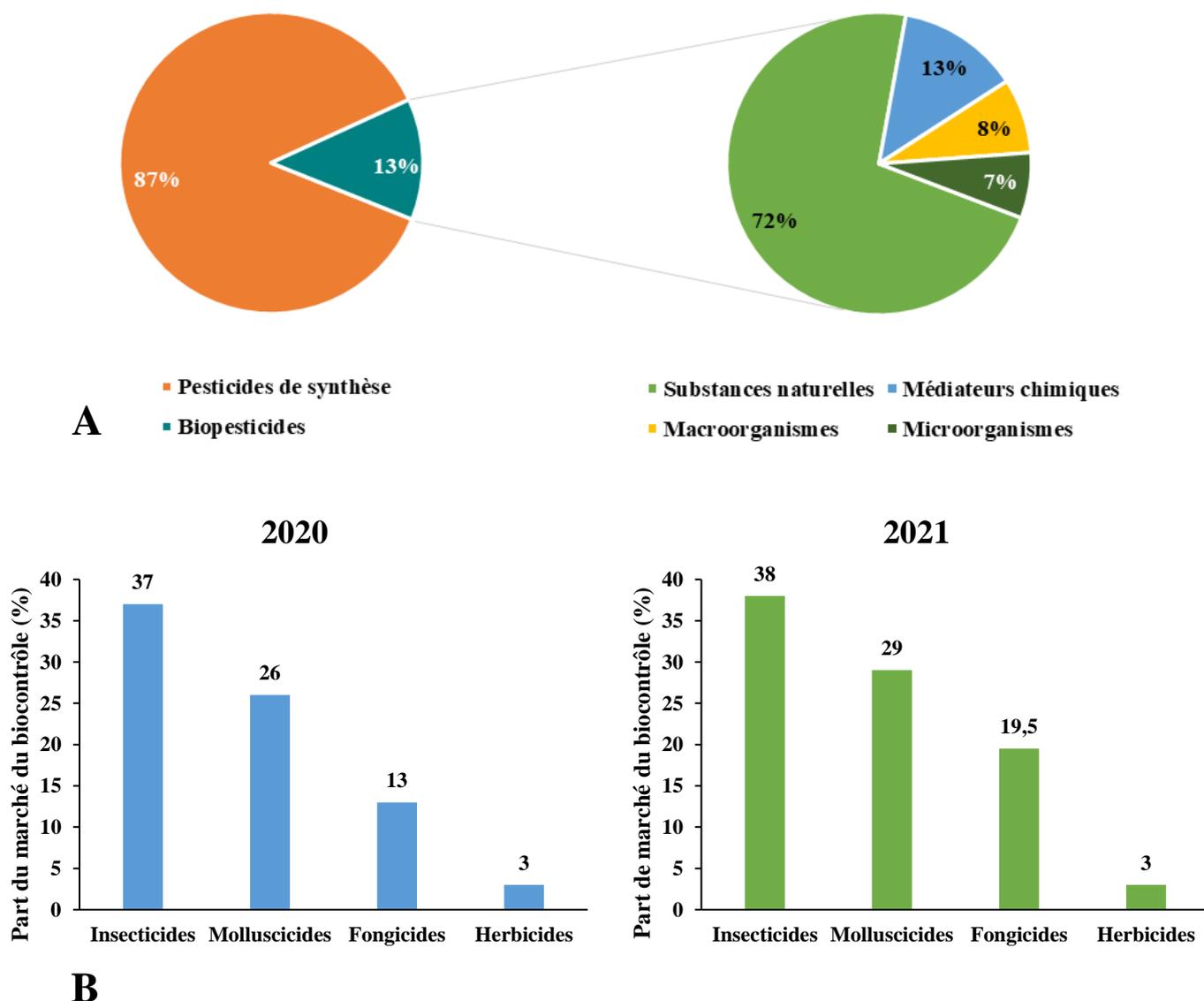


Figure 4 : Aperçu du marché du biocontrôle : **A)** Part du marché du biocontrôle dans les ventes de produits pour la protection des plantes en France en 2021, selon les catégories d'agents de biocontrôle considérés. **B)** Evolution des parts du marché du biocontrôle selon les segments (insecticides, molluscicides, fongicides et herbicides) entre 2020 et 2021 (IBMA).

3.1 Définition du biocontrôle

Afin de réduire l'utilisation des pesticides chimiques, des solutions alternatives doivent émerger. Parmi les différentes possibilités, telles que l'évitement de l'infection par l'utilisation de variétés résistantes, la rotation des cultures, ou autres, le biocontrôle est une solution qui a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années. Cette notion a été introduite officiellement en France en 2014 avec la loi d'avenir pour l'agriculture.

Selon le Ministère Français de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire, le biocontrôle est un ensemble de méthodes de protection des plantes basées sur l'utilisation de mécanismes naturels. Les produits de biocontrôle, quant à eux, sont définis à l'article L. 253-6 du code rural et de la pêche maritime comme des agents et des produits utilisant des mécanismes naturels dans le cadre de la lutte intégrée contre les ennemis des cultures. Dans cette définition sont compris : les macroorganismes et les produits phytopharmaceutiques (qui incluent microorganismes, médiateurs chimiques – phéromones, kairomones, substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale). Les définitions du biocontrôle ou des biopesticides diffèrent selon les pays. Le 22 juin 2022, dans la feuille de route pour réduire de moitié d'ici à 2030 l'utilisation et les risques à l'échelle de l'Union européenne des pesticides chimiques ou dangereux, la Commission Européenne a proposé la définition suivante du biocontrôle : « le biocontrôle est la lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux à l'aide de moyens naturels d'origine biologique ou de substances identiques à ceux-ci, tels que des micro-organismes, des substances sémi-chimiques, des extraits de produits végétaux [...] ou des macroorganismes invertébrés ». Dans ces définitions, les substances sémi-chimiques ou médiateurs chimiques comprennent des molécules naturelles émises dans l'environnement par un organisme, et qui ont un rôle de signalisation. Les macroorganismes (invertébrés, insectes, nématodes ou acariens) sont eux des prédateurs de ravageurs de culture ; les substances naturelles peuvent être, selon les définitions, végétales, provenir de macro- ou microorganismes, ou minérales. Enfin les microorganismes comprennent les champignons, bactéries et les virus, dont les phages.

La solution du biocontrôle est donc un modèle de traitement des cultures de plus en plus encouragé. De nombreux gouvernements ont édicté des directives qui incitent au développement de solutions respectueuses de l'environnement en agriculture comme par exemple le plan Ecophyto en France, et plus largement, le Green Deal ou Pacte Vert européen - IEEP. Le plan Ecophyto II+ vise entre autres à réduire de 50 % l'utilisation des produits phytosanitaires d'ici 2025. Un budget de 71 millions d'euros est consacré à ce plan par le gouvernement français. Le biocontrôle fait partie des solutions alternatives aux traitements conventionnels dont le développement est encouragé par le plan Ecophyto II+.

Le développement de ces nouveaux moyens de lutte contre les pathogènes nécessite, comme tout autre produit pharmaceutique, des autorisations spécifiques – autorisation de mise sur le marché ou AMM – qui sont délivrées par l'ANSES en France. Tous les produits de biocontrôle sont concernés par ces AMM, sauf les macroorganismes. Les délais prévus pour statuer sur une

demande d'AMM sont plus courts que pour des produits phytopharmaceutiques de synthèse : seulement six mois au lieu de douze mois.

3.2 Avantages du biocontrôle

Le biocontrôle est une solution alternative voire complémentaire aux produits de synthèse. De ce fait, il présente certains avantages par rapport aux solutions conventionnelles.

Tout d'abord, les solutions de biocontrôle ont rarement une seule cible, et selon la composition du produit de biocontrôle, les modes d'action peuvent être variés et ainsi limiter l'apparition de résistance chez les pathogènes ciblés. Par exemple, les agents de biocontrôle cités comme étant autorisés dans la lutte contre les fusarioses en France, *Pythium oligandrum* et *Bacillus subtilis*, présentent plusieurs modes d'action : *P. oligandrum* peut protéger les plantes directement via le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition et indirectement via l'induction de la résistance chez les plantes (Gerbore et al. 2014) ; pour *Bacillus subtilis*, le même type d'interaction avec les pathogènes et les plantes peut être observé (Nagórska et al. 2007).

En comparaison avec les fongicides chimiques, les agents de biocontrôle ont un temps de rémanence dans l'environnement plus réduit. Pour les substances naturelles, les temps de rémanence dans le sol et l'eau peuvent être d'à peine quelques jours (Isman 2000), et dans le cas des microorganismes, ce temps dépend du type de souche et des conditions dans lesquelles l'implantation s'est faite (Vázquez et al. 2013), ces souches étant souvent des microorganismes issus de la rhizosphère (comme *Trichoderma*, *Bacillus* ou *Pseudomonas*) et de ce fait pouvant subsister dans ce type d'environnement pendant plusieurs mois (Larkin 2016). Ceci est un point crucial sur lequel il faut jouer pour l'efficacité du produit qui doit perdurer assez longtemps pour agir sur le pathogène mais aussi pour éviter une accumulation dans les sols, les milieux aquatiques ou les organismes vivants.

En ce qui concerne la toxicité, un objectif majeur du développement de produits de biocontrôle est de proposer des actifs moins toxiques que les fongicides de synthèse. Certains agents de biocontrôle sont ainsi considérés comme n'ayant aucun effet néfaste pour l'environnement ou les humains. C'est par exemple le cas des agents de biocontrôle déjà utilisés dans la fermentation alimentaire, comme les bactéries lactiques (Donohue et al. 1993) ou *Aspergillus oryzae* (Barbesgaard et al. 1992).

Un autre intérêt des produits de biocontrôle est la possibilité de les employer dans le cadre de l'agriculture biologique, si ceux-ci remplissent le cahier des charges, c'est-à-dire n'étant pas des organismes génétiquement modifiés et/ou n'en impliquant pas dans leur production.

3.3 Substances naturelles

Parmi les solutions de biocontrôle existantes pour supplanter les produits antifongiques de synthèse existent les substances naturelles, qui peuvent inclure des molécules produites par des plantes, des microorganismes ou des macroorganismes, mais aussi des composés d'origine minérale comme le soufre ou le bicarbonate de potassium. Les substances naturelles bioactives d'origine végétale, animale ou microbienne appartiennent généralement aux classes des terpènes, des phénols et des alcaloïdes (Freeman 2008).

Ces substances peuvent avoir différentes cibles et modes d'action. En effet, certaines substances naturelles ont une action généralisée sur les mécanismes de défense des plantes : ce sont des éliciteurs. Ces molécules conduisent à une réponse rapide de la plante une fois reconnues par les récepteurs membranaires des cellules végétales, induisant en premier lieu une résistance locale (Aziz et al. 2003), puis amenant à une résistance systémique induite ou une résistance systémique acquise qui rend la plante moins susceptible à des attaques subséquentes de pathogènes. En outre, ces éliciteurs peuvent avoir une double action, d'une part, l'induction des défenses de la plante, et d'autre part, la promotion de sa croissance (Cai et al. 2013).

Les substances naturelles peuvent également avoir une action fongistatique (ralentissement de la croissance du champignon) ou fongicide. C'est le cas par exemple de l'hydrogénocarbonate de potassium, ou bicarbonate de potassium, qui est utilisé comme produit de biocontrôle. Ce dernier peut totalement inhiber la croissance linéaire de *F. oxysporum* à une concentration de 4 % (Ragab et al. 2012). L'huile essentielle de thym, et plus particulièrement le thymol et le carvacrol, deux composés phénoliques qui la compose, permet de ralentir voire d'inhiber totalement la croissance et la germination de spores de champignons comme *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, et d'espèces de *Penicillium* par exemple (Sapper et al. 2018; Maissa, Walid 2015; Boubaker et al. 2016). Les composés de plantes autres que les huiles essentielles peuvent également avoir des effets antifongiques comme l'ail (Shang et al. 2019). Aussi les substances naturelles provenant d'autres organismes comme la laminarine des algues brunes (Aziz et al. 2003) ou les carraghénanes des algues rouges (Vera et al. 2012) présentent des activités antifongiques, notamment contre *Botrytis cinerea* ou *Plasmopara viticola*. La chitine, composé de la cuticule des crustacés et le chitosan qui en est un dérivé, présentent une activité contre plusieurs champignons et oomycètes (El Hadrami et al. 2010).

Les métabolites secondaires de microorganismes suscitent un grand intérêt pour leur activité antifongique : parmi ceux-ci, les lipopeptides, produits notamment par les espèces de *Bacillus*

(Mejri et al. 2018) et *Pseudomonas* (Fiore et al. 2008), les métabolites secondaires des bactéries lactiques (Lynch et al. 2016; Cortés-Zavaleta et al. 2014) ou encore les sidérophores (Bharucha et al. 2013), qui ne présentent pas de toxicité pour l'environnement. Ces métabolites secondaires seront décrits plus précisément dans la partie 5.

3.4 Microorganismes

Les microorganismes sont un autre type d'agents de biocontrôle utilisés dans la lutte contre les phytopathogènes fongiques. Sont inclus dans cette dénomination les bactéries, les champignons et les virus. Les microorganismes représentaient en 2021 7 % du chiffre d'affaire du marché du biocontrôle, contre 72 % pour les substances naturelles (Figure 4B). Les champignons et les bactéries habituellement utilisés en biocontrôle en France ainsi que ceux présentant des activités intéressantes seront détaillés dans la partie 5.

Les microorganismes, tout comme les substances naturelles, offrent un large éventail de modes d'action. Ils peuvent être séparés en deux types d'effets : l'antagonisme direct (comme la compétition pour les nutriments, les sites d'infection ou le parasitisme) et l'antagonisme indirect (promotion de la défense des plantes) (Fravel et al. 2003; O'Brien 2017).

Les virus de champignons, ou mycovirus, ont la capacité de réduire voire de complètement neutraliser la virulence des champignons phytopathogènes, selon un phénomène d'hypovirulence (Yu et al. 2010).

Les bactéries représentent une ressource riche d'activités potentielles de par leur nombre et l'existence de PGPR ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes). Ces bactéries se retrouvent au niveau de l'environnement immédiat des racines des plantes – la rhizosphère – et se caractérisent par des activités de promotion de la croissance des plantes, mais aussi de protection des plantes (Pal et al. 2000; Jog et al. 2014). Parmi ces dernières, beaucoup d'espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* ou *Streptomyces* sont utilisées dans le biocontrôle. Les bactéries endophytes – existant à l'intérieur de la plante – possèdent elles aussi des activités antifongiques (Tanvir et al. 2016; Taechowisan et al. 2003a).

De la même façon, de nombreux champignons existant à l'interface plante-racine, comme les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF : arbuscular mycorrhizal fungi) ou les champignons de la rhizosphère plus largement peuvent jouer un rôle dans la défense des plantes et la promotion de leur croissance (Al-Askar, Rashad 2010). Les champignons endophytes constituent également des solutions de biocontrôle potentielles (Paul et al. 2007; Wang et al. 2013). En outre, il est possible d'utiliser des extraits de paroi de champignon, par exemple de

levure (*Saccharomyces cerevisiae*) afin de stimuler les défenses des plantes (De Miccolis Angelini et al. 2019).

3.5 Applications pratiques : solutions utilisées contre *Fusarium*

Actuellement, seuls quatre agents de biocontrôle (Tableau 1) sont autorisés en France pour une utilisation contre *Fusarium* (ANSES). Leur nombre reste donc très limité. L'un d'entre eux est constitué de spores de *Pythium oligandrum*, un oomycète, qui peut coloniser les champignons et qui est accrédité et utilisé comme BCA (Benhamou et al. 1997), l'autre étant un *Bacillus subtilis*, une bactérie également utilisée comme BCA (Cao et al. 2011). Les deux autres produits sont à base d'hydrogénocarbonate de potassium, qui est un fongicide minéral (Ragab et al. 2012).

Tableau 1 : Produits de biocontrôle autorisés en 2022 en France dans la lutte contre les fusarioses

Nom commercial	Agent de biocontrôle	Culture
ANL-F004	Hydrogénocarbonate de potassium	Blé
Echiquier	Hydrogénocarbonate de potassium	Blé
Harmonix Turf Defense	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	Graminées
Polyversum	<i>Pythium oligandrum</i> M1	Blé, Orge

Il reste à noter que plusieurs autres composés ou microorganismes présentent une activité antifongique (fongistatique ou fongicide) contre *Fusarium* mais ne sont pas autorisés sur le marché (Matarese et al. 2012; Zulqarnain et al. 2020).

3.6 Limites du biocontrôle

La recherche de nouveaux agents de biocontrôle s'effectue *in vitro* : ceci permet de tester différentes molécules ou microorganismes, de multiplier les cibles et d'évaluer la toxicité et la dégradation de composés avant de les tester *in planta* ou au champ. Cependant, une efficacité *in vitro* ne se traduit pas nécessairement par une même efficacité *in planta* ou au champ, du fait de la présence de conditions non maîtrisées comme des stress abiotiques variés (Jindo et al. 2020). Cela s'observe également par le nombre très limité de produits de biocontrôle reconnus pour leur efficacité en plein champ par rapport au nombre de solutions testées *in vitro* (Usall et al. 2016).

La durée de vie ou rémanence d'un produit de biocontrôle est, comme indiqué précédemment, plus courte que celle des fongicides chimiques. A cela s'ajoutent les conditions biotiques et abiotiques qui peuvent influencer son activité, comme la quantité d'inoculation ou le climat (Fravel et al. 2003). L'efficacité des produits de biocontrôle dans le temps est en outre souvent comparée à celle des fongicides de synthèse, mais le biocontrôle induit des changements à long terme (Popp et al. 2013). Le coût des produits de biocontrôle peut limiter leur utilisation, que ce soit le coup de production, de l'homologation, celui pour l'agriculteur ou le coût final d'un produit obtenu à partir d'une agriculture respectueuse de l'environnement (Fravel 2005; Gerhardson 2002).

Des études ont également été réalisées sur la perturbation éventuelle de la microflore édaphique par les agents de biocontrôle introduits. Ces derniers peuvent impacter les communautés microbiennes : à la suite de traitements avec *Trichoderma virens*, le nombre d'individus des communautés bactériennes et fongiques des sols ont montré une augmentation significative par rapport à ce qui est observé en l'absence de traitement (Bernard et al. 2012). Cependant, il est généralement observé que ces effets sont moindres et limités dans le temps du fait d'un temps de rémanence inférieure à celle des fongicides de synthèse (Savazzini et al. 2009; Correa et al. 2009).

La toxicité des agents de biocontrôle n'est pas non plus inexistante ; certains microorganismes utilisés dans la lutte contre les champignons pathogènes produisent des molécules toxiques pour les animaux et les humains. C'est le cas de certains peptaibols (peptides) produits par des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium* qui présentent une toxicité pour les animaux et les humains (Favilla et al. 2006; Peltola et al. 2004).

La recherche de nouveaux agents de biocontrôle, pour lutter contre de nouveaux phytopathogènes, est une tâche difficile et rarement couronnée de succès en comparaison avec le développement ou l'usage de fongicides de synthèse à large spectre. Il peut s'avérer encore plus difficile d'identifier de nouvelles molécules naturelles ayant une action satisfaisante contre les pathogènes ciblés (O'Brien 2017). L'une des stratégies prometteuses du biocontrôle vise à recréer des interactions naturelles dans un environnement contrôlé et surtout sur le terrain. Cependant, recréer ces interactions *in vitro* peut être particulièrement difficile, car les interactions observées dans la nature impliquent souvent un écosystème complexe, de nombreux organismes et plus d'une molécule active. En outre, une molécule ayant une certaine activité n'équivaut pas forcément à une activité antifongique, et le plus souvent les microorganismes produisent des molécules qui peuvent agir de manière synergique ou

s'organisent en structures permettant un effet antagoniste (biofilms). Cela conduit à une incapacité généralisée à synthétiser certaines molécules dans des conditions de laboratoire, notamment les métabolites secondaires. Ceci est particulièrement documenté pour les microorganismes qui ont des génomes séquencés et sont reconnus *in silico* pour leur potentiel à synthétiser certaines molécules bioactives, mais dont la production *in vitro* a échoué (Omura et al. 2001). Cela peut être dû au manque d'expression des gènes susmentionnés, qui peut se produire en raison de l'absence de conditions adéquates pour leur expression (Scherlach, Hertweck 2009).

La recherche de nouveaux agents de biocontrôle à partir d'isollements environnementaux est une stratégie qui fait sens dans cette optique. Cependant, beaucoup de ces études procèdent à l'isolement de souches individuelles qui cohabiteraient dans un même environnement au départ. Dans une étude de 2007, 354 souches bactériennes issues d'anthères de blé ont été testées individuellement pour leur effet antagoniste sur l'agent pathogène responsable de la fusariose. Seules 22 de ces souches ont réduit la croissance du champignon (Palazzini et al. 2007). Cela pose la question de l'efficacité des méthodes traditionnelles de cultures axéniques pour trouver de nouvelles activités.

L'une des principales limites à la culture d'agents de biocontrôle concerne l'aval de leur développement, avec une nécessité de garder une efficacité au champ stable, une toxicité moindre par rapport aux fongicides de synthèse, ainsi qu'un effet sur l'environnement et les communautés microbiennes du sol réduit. Une autre limite concerne les difficultés rencontrées en amont pour la recherche et le développement des produits de biocontrôle, au niveau de la recherche de nouvelles activités, nouveaux microorganismes et nouveaux métabolites secondaires d'intérêt. Ceci définit la nécessité d'appréhender cette recherche d'une nouvelle manière ; l'introduction de la co-culture est un moyen intéressant de contourner ces limites.

4. Méthodes pour trouver de nouvelles activités : le cas de la co-culture

Il existe plusieurs moyens de susciter l'expression des gènes silencieux – et ainsi découvrir de nouvelles activités et de nouveaux métabolites d'intérêt – qui sont plus ou moins complexes et coûteux à mettre en œuvre. Il y a par exemple la méthode OSMAC (One Strain Many Compounds) - où plusieurs paramètres de culture sont modifiés afin de voir une adaptation de la réponse métabolique d'un microorganisme (Abdelwahab et al. 2018), ou encore l'utilisation d'éléments des terres rares ou le *genome mining* afin de découvrir de nouvelles molécules (Tanaka et al. 2010).

Parmi ces solutions, la co-culture est particulièrement intéressante car elle peut simuler des interactions susceptibles d'exister dans la nature (Vinale et al. 2017). Cela permet de mettre en place des interactions qui n'existeraient pas en monoculture, et donc d'induire la production de molécules qui ne seraient pas produites autrement, ou en plus grande concentration qu'elles ne le seraient en monoculture (Liu, Kakeya 2020). Dans ce projet, la co-culture a été choisie comme méthode de découverte de nouvelles activités antifongiques contre *Fusarium*.

4.1 Définition : Qu'est-ce que la co-culture ?

La co-culture est la culture de deux ou plusieurs populations de cellules qui sont cultivées avec un certain degré de contact entre elles. Les objectifs typiques d'une co-culture peuvent être d'étudier les interactions naturelles entre les populations, d'améliorer le taux de réussite des cultures pour certaines populations ou d'établir des interactions synthétiques entre les populations. Ainsi, une co-culture peut conduire à l'expression de gènes qui seraient autrement silencieux ou à un niveau de production plus élevé de certaines molécules (Goers et al. 2014).

La co-culture se présente donc comme un moyen efficace de découvrir de nouvelles molécules actives, par exemple des antibiotiques (Netzker et al. 2018), faisant de la co-culture une méthode de plus en plus utilisée pour l'étude des microorganismes et la production de métabolites secondaires.

De ce fait, l'intérêt pour la co-culture n'a cessé de croître au fil des ans notamment depuis le début des années 2010, où le nombre de publications portant sur le sujet a dépassé le millier par an (Figure 5). La première occurrence sur SCOPUS d'une publication portant sur la co-culture remonte à 1962, où le champignon *Penicillium verruculosum* a été mis en présence de plusieurs

autres champignons afin d'étudier leur influence sur la production d'un pigment rouge par ce dernier (Nasuno, Asai 1962).

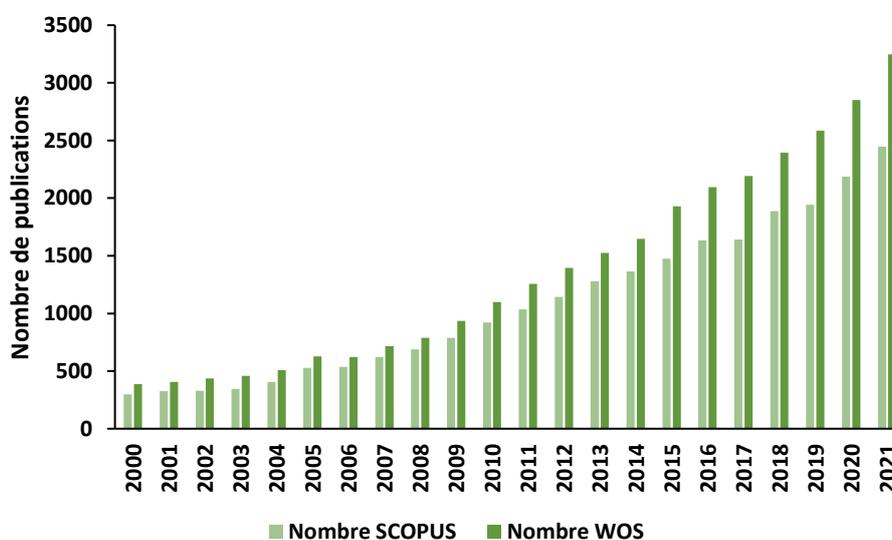


Figure 5 : Occurrence du mot co-culture dans les publications récentes, recherchées comme mot-clé sur Scopus et Web of Science pour les années 2000 à 2021.

Dans le cadre de co-cultures, notamment microbiennes, les interactions impliquées peuvent être de différents types (Tshikantwa et al. 2018). Certaines de ces interactions peuvent être positives : c'est le cas du mutualisme et du commensalisme. Le mutualisme est une interaction bénéfique pour les deux partenaires. Elle peut par exemple se traduire par un meilleur développement des deux partenaires par rapport aux partenaires seuls (Venkataraman et al. 2011). Le commensalisme décrit une situation où un partenaire tire des bénéfices de l'interaction, tandis que l'autre n'est pas impacté (Taniguchi, Tanaka 2004). D'autres interactions sont négatives ; c'est alors de la prédation, du parasitisme, de l'amensalisme et de la compétition. La prédation est une relation proie-prédateur où le prédateur se nourrit de la proie (Ibrahimi et al. 2020). Le parasitisme quant à lui dépeint le cas où un partenaire tire des bénéfices de l'interaction au détriment de l'autre, et cela implique la survie de ce dernier, contrairement à la prédation (Moscoviz et al. 2017). L'amensalisme est le pendant du commensalisme : un partenaire a un effet négatif sur l'autre, sans être lui-même impacté (García et al. 2017). Dans le cas de la compétition, les partenaires sont en concurrence pour les ressources en énergie et les nutriments. Cette situation se solde souvent par un partenaire prenant le dessus sur l'autre (Mellefont et al. 2008).

Il existe également le cas où aucune interaction n'est observée entre les microorganismes, qui sont dans ce cas indifférents à la présence de l'autre (Licyayo et al. 2007).

Il est possible d'influencer le type d'interaction désiré selon les conditions de co-culture choisies, afin de privilégier un certain type de production. Par exemple, des interactions négatives peuvent conduire à la production d'un certain type de métabolite, comme des toxines, des antibiotiques et des alcaloïdes afin d'inhiber la croissance de l'antagoniste (Padmaperuma et al. 2018). Dans le cas d'interactions symbiotiques, la production d'hormones ou de facteurs de croissance peut être observée (Magdouli et al. 2016). La division du travail entre différents microorganismes en co-culture via l'extension de leurs fonctions et de leur capacités métaboliques, par exemple pour la dégradation de composés ou l'obtention d'énergie, a également été décrite (Hays et al. 2015).

Les co-cultures ont un grand nombre d'applications potentielles, de par leur avantage principal qui est de recréer des interactions déjà existantes dans la nature ou de créer de nouvelles interactions. Elles peuvent être utilisées pour la dégradation, la production d'énergie, la production de métabolites d'intérêt, une meilleure culture d'un ou deux organismes, voire la culture de microorganismes ne pouvant pas se développer en conditions axéniques (Goers et al. 2014; Hays et al. 2015; Padmaperuma et al. 2018).

Lorsque la co-culture est utilisée pour exprimer une activité antifongique, l'utilisation de certains microorganismes récurrents en biocontrôle est très fréquente, comme *Bacillus*, *Trichoderma* ou *Streptomyces*, pour citer quelques exemples (Benoit et al. 2015; Ola et al. 2013; Wu et al. 2015). Ces exemples de co-cultures seront détaillées dans la partie 5. Il existe également des co-cultures impliquant des microorganismes plus originaux, notamment dans le cadre de l'étude des interactions naturelles ou de la recherche de nouvelles molécules d'intérêt pour lutter contre des pathogènes (Halecker et al. 2020).

4.2 Différents types de co-cultures

Il est possible de jouer sur différents paramètres d'une co-culture afin d'influer sur la croissance et le développement des microorganismes ainsi que leur éventuelle production. Ces paramètres peuvent être de l'ordre physique (température, agitation, durée de culture) mais aussi biochimique (type et composition du milieu) voire biologique (quantité, ratio et synchronisation ou non de l'inoculation).

4.2.1 Co-cultures impliquant des espèces similaires jusqu'à des genres différents

Différents modèles de co-culture peuvent exister ; si certains sont très utilisés en médecine, impliquant des co-cultures de cellules animales ou humaines différenciées (Arnold et al. 2001), cette revue de l'état de l'art porte sur les co-cultures impliquant exclusivement des microorganismes.

Dans la littérature, des descriptions de la co-culture entre deux microorganismes appartenant au même groupe taxonomique (c'est-à-dire bactérie-bactérie ou champignon-champignon) (Bertrand et al. 2013; Srivastava et al. 2018) ou à des groupes différents (par exemple bactérie-champignon) se retrouvent (Ola et al. 2013; Wu et al. 2015). Il existe également des co-cultures impliquant des protozoaires comme les amibes (Evstigneeva et al. 2009), ou des microalgues (Zhang, Hu 2012). Chaque configuration présente des avantages et des inconvénients, notamment concernant le type de comportement entre les microorganismes, le type de production engendré, et la possibilité de cultiver ces microorganismes ensemble (Baré et al. 2010). Des co-cultures de populations très différentes peuvent conduire à des interactions plus complexes, comme la formation de modèles (pattern formation : ici auto-organisation de cellules en des structures complexes et ordonnées) ou la création de symbioses (Lorincz et al. 2010).

Il est ainsi tout à fait possible de mettre en place des co-cultures impliquant plusieurs populations – pouvant aller jusqu'à plus d'une dizaine de partenaires – bien que la configuration la plus représentée soit deux populations différentes. L'augmentation du nombre de populations différentes a aussi un impact sur la complexité de la co-culture. Ceci peut par exemple mener à la création d'une communauté microbienne artificielle où l'on peut observer des relations synergiques – comme le développement de conditions favorables à la croissance de certains partenaires – et des relations négatives – inhibition de l'activité métabolique d'un partenaire par exemple – entre les différents partenaires impliqués (Kato et al. 2005; Mee et al. 2014).

4.2.2 Niveau de contact entre les organismes co-cultivés

La co-culture étant une mise en présence de différentes populations de cellules, le contact entre les cellules est un paramètre qu'il est possible d'influencer. Si l'option la plus souvent choisie est une co-culture avec un contact direct entre les différentes populations de cellules, il existe des alternatives modulant ainsi le contrôle et le suivi des interactions entre les populations. Les productions des co-cultures peuvent alors être en contact grâce à un milieu liquide (Sabra et al. 2010) ou par des échanges gazeux (Weber et al. 2007), tandis que les microorganismes eux-

mêmes sont séparés (Figures 6A et 6B). Ce type d'interface impacte le mode de communication entre les cellules et permet la co-culture d'organismes très différents.

Dans le cas alternatif où les populations sont en contact (Figure 6C), la symétrie entre les populations est un critère souvent retenu, avec des taux de croissance et des besoins en nutriments similaires. Si au contraire, des populations très différentes sont considérées, ces dernières peuvent être cultivées séparément dans des conditions différentes afin d'atteindre le développement désiré avant inoculation des partenaires dans le même milieu. Les conditions de culture – comme le milieu – sont alors un facteur important pour le développement de tous les partenaires, et leur sélection un point crucial pour la réalisation des co-cultures (Klitgord, Segrè 2010). Il est également possible d'envisager la création de consortia où il existe un contrôle de croissance entre les populations à travers la communication entre cellules (Biliouris et al. 2012), ou une auxotrophie pour un élément du milieu (Chuang et al. 2010) et de ce fait empêcher une population de prendre le dessus sur l'autre.

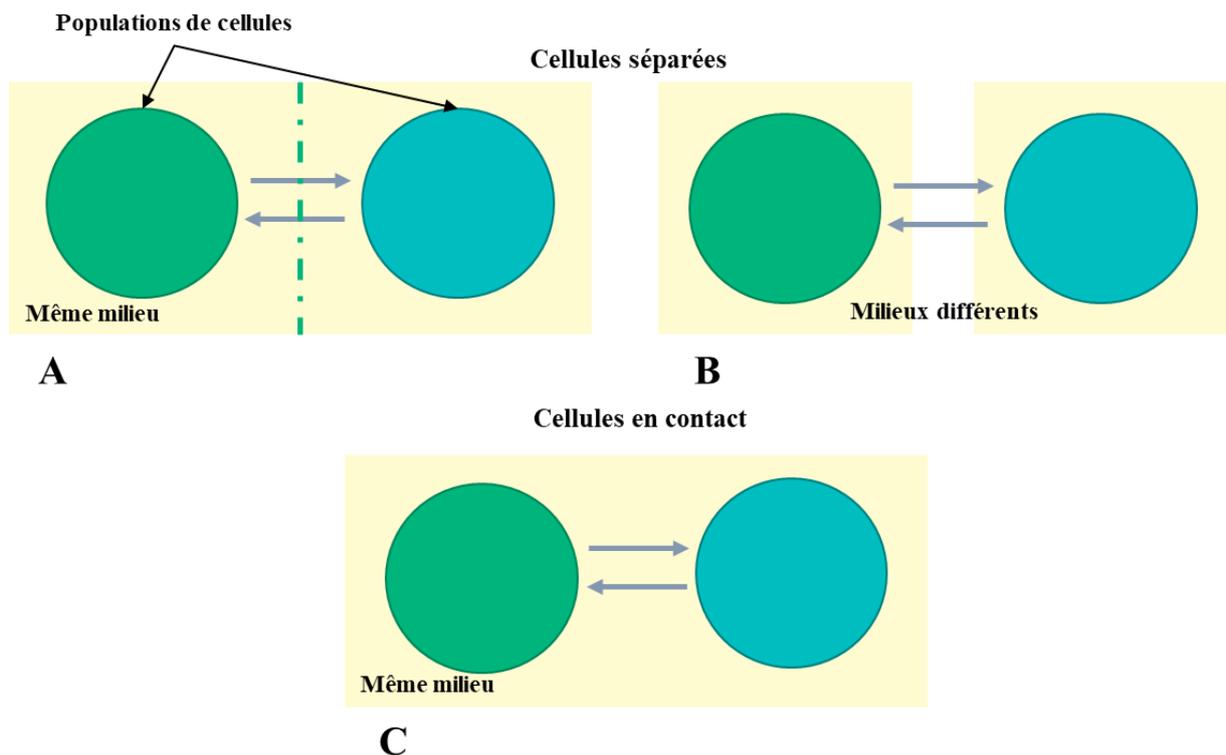


Figure 6 : Exemples de niveaux de contact entre des populations de cellules mises en co-culture : **A)** Les cellules peuvent être séparées mais leurs productions peuvent s'échanger dans un même milieu, **B)** Les cellules peuvent être séparées et cultivées dans des conditions différentes, et échanger des productions gazeuses, **C)** Les cellules peuvent être en contact dans le même milieu et leurs productions s'échanger.

4.2.3 Type de milieu

Le milieu de culture est donc un paramètre qui a son importance dans les co-cultures. Dans le cas de co-cultures où les populations sont en contact direct, il est nécessaire d'avoir des conditions de culture au minimum compatibles avec le développement des différentes populations. Dans le cas des microorganismes qui ont été isolés de consortia symbiotiques par exemple, leurs conditions de croissance d'origine seront idéales. Si la co-culture est synthétique, il est alors nécessaire de trouver des conditions de culture convenant à tous les partenaires. Il est possible d'envisager l'utilisation d'un milieu de culture adapté à la croissance d'un des deux partenaires (Yen et al. 2015), ou un mélange des conditions adaptées aux différents partenaires (Zhang et al. 2014). L'ajout d'un élément manquant (notamment une source de glucose ou d'azote) peut permettre la croissance d'un partenaire dans un milieu de culture dans lequel il ne pouvait pas se développer (Fifani et al. 2022).

Le milieu de culture en lui-même peut être liquide (Rateb et al. 2013), incluant des modèles de culture submergée (Flores et al. 2010), solide sur milieu gélosé (Bertrand et al. 2014) ou bien utilisant un substrat pauvre en eau libre habituellement observé en fermentation en milieu solide (Moussa et al. 2020), ou une matrice sur laquelle les cellules peuvent se développer de façon compartimentalisée comme un hydrogel par exemple (Johnston et al. 2020).

Le volume dans lequel la co-culture est réalisée est un paramètre déterminé par l'application souhaitée de cette dernière. Il influence en effet la croissance des microorganismes et la production de métabolites. Par exemple, si l'on veut réaliser un criblage et déterminer des conditions nécessaires pour obtenir un système donné, une plus petite échelle est préférable. L'échelle du millilitre est la plus représentée, mais il existe des modèles de culture de l'ordre du microlitre, comme ceux impliquant la microfluidique (Balagaddé et al. 2008; Burmeister, Grünberger 2020), des systèmes de plaque 96 puits (Chen et al. 2021), ou des microgouttes sur des boîtes de Petri (Byun et al. 2013). L'échelle du nanolitre peut même être utilisée afin de réaliser des tests à haut débit (Park et al. 2011).

Si l'objectif de la co-culture est la production, de plus grands volumes sont utilisés, notamment dans des bioréacteurs. L'échelle du litre est alors considérée (Buzzini 2001). Cependant, l'homogénéité du milieu de culture n'est pas garantie dans de grands volumes, dans lesquels l'agitation n'est pas la même partout. Aussi, le volume du réacteur peut influencer la viabilité des cellules (Shou et al. 2007). Des co-cultures sont tout de même rapportées à l'échelle pilote de 400 à 1000 L (Priya et al. 2015).

4.2.4 Densité de la population : jouer sur l'inoculation

Un autre paramètre modulable de la co-culture est la densité de chaque population et le rapport entre elles, ainsi que le moment et l'ordre de l'inoculation (Chen et al. 2019). Les ratios d'inoculations peuvent être testés dans le cas de co-cultures synthétiques par rapport à l'objectif de l'étude ; un certain ratio peut amener à la domination d'un type de cellules par rapport à un autre, voire à son élimination (Goers et al. 2014). En outre, selon la durée de la co-culture (système stable de plusieurs populations ou durée courte), ce ratio est plus ou moins important. Aussi, les consortia naturels peuvent être réduits et redéfinis dans des conditions industrielles afin d'éviter ce genre de problématique (Valdez-Vazquez, Poggi-Varaldo 2009). Ces données peuvent également modifier les performances de la co-culture, comme la production de métabolites d'intérêt (Buzzini 2001) ou la dégradation de composés (Chen et al. 2019).

4.2.5 Echelle de temps de la co-culture

Selon les objectifs attendus de la co-culture, l'échelle de temps est encore un paramètre qu'il faut prendre en compte. Celle-ci peut être très courte, si l'on veut uniquement étudier des interactions entre cellules : de l'ordre de quelques minutes ou de quelques heures. Dans le cas de la production de molécules, des systèmes plus stables sont recherchés, avec des temps de culture pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines (Shou et al. 2007). Si l'objectif est une évolution particulière de la co-culture, par exemple si toutes les populations doivent survivre, le modèle gagne en complexité et demande une optimisation. Certaines configurations, comme par exemple le déplacement de colonies bactériennes de microgoutte en microgoutte afin de parer à un appauvrissement des ressources (en oxygène, en nutriments), permettent de garder des co-cultures stables plus longtemps, allongeant ainsi la durée de culture (Byun et al. 2013).

La production de métabolites est dépendante de la durée de la co-culture mais également du moment choisi pour réaliser l'extraction ou l'observation de l'activité. Aussi, certains métabolites sont uniquement produits au départ de la co-culture, tandis que d'autres sont produits durant toute la co-culture, voire plus tardivement ou sur une durée plus longue (Bertrand et al. 2014; Azzollini et al. 2018).

Cependant, l'échelle de temps des co-cultures n'est pas toujours bien explorée ou même optimisée, avec la plupart des co-cultures décrites à l'échelle des heures ou des jours, sans que les systèmes ne soient cultivés plus longtemps, alors que l'évolution des populations et la production de métabolites sont dépendantes de la durée de la culture (Arora et al. 2020).

5. Microorganismes et biocontrôle

Dans le cadre de ce projet, les interactions recherchées sont celles entre des bactéries et des champignons plus particulièrement, dans l'optique d'engendrer notamment des interactions antagonistes. Comme cela a été discuté précédemment, les interactions antagonistes, comme la prédation, l'amensalisme, la compétition ou le parasitisme, engendrent la production de métabolites tels que des antibiotiques, des toxines, ou encore des enzymes lytiques afin d'enrayer la croissance de l'antagoniste ou d'entrer en compétition pour les nutriments disponibles (Tengku Norsalwani et al. 2012). Les co-cultures bactéries-champignons présentent l'intérêt d'augmenter la complexité des interactions générées, et donc de moduler la production de métabolites secondaires par les partenaires (Liu, Kakeya 2020).

Un certain nombre de genres sont étudiés pour leur activité biologique, notamment antifongique ; c'est le cas des genres *Bacillus*, ou *Pseudomonas*, connus pour leur production de lipopeptides (Fiore et al. 2008; Mejri et al. 2018), *Streptomyces*, qui produit des antibiotiques parmi d'autres métabolites secondaires intéressants (Hobbs et al. 1990) ou *Trichoderma*, un champignon qui est également un mycoparasite (Benítez et al. 2004). Ces genres sont bien connus et ont de nombreuses utilisations non seulement dans le biocontrôle mais aussi dans le domaine médical. *Aspergillus* est un autre genre étudié notamment comme pathogène cible pour les tests antifongiques (Zhao et al. 2013) mais aussi comme producteur de puissants métabolites secondaires antifongiques (Brzezinska, Jankiewicz 2012). Cela est aussi le cas pour *Fusarium*, notamment *Fusarium oxysporum*, dont les espèces non pathogènes sont utilisées dans le cadre du biocontrôle (Fravel et al. 2005).

Dans la recherche de composés antifongiques, d'autres genres et espèces peuvent être considérés, comme par exemple les endophytes, qui peuvent protéger la plante grâce à plusieurs mécanismes, dont la production de métabolites secondaires entre autres (O'Brien 2017), ou des microorganismes de la rhizosphère, qui peuvent également être impliqués dans la protection de plantes (Al-Askar, Rashad 2010; Jog et al. 2014). Les effets de ces microorganismes peuvent également être combinés, dans des systèmes potentiellement existant dans la nature, comme la co-inoculation d'AMF et de PGPR (Jaizme-Vega et al. Núñez 2006; Krzyzaniak et al. 2021).

Les genres fongiques et bactériens considérés dans cette étude sont ceux reconnus pour leur activité antifongique, notamment contre *Fusarium* ; leur utilisation en biocontrôle et leur capacité à être co-cultivés seront discutés.

5.1 Champignons utilisés dans le biocontrôle

Le règne des Fungi est extrêmement diversifié, avec un nombre d'espèces estimé à plusieurs millions dans le monde (Blackwell 2011), et parmi ces espèces, moins de 10 % ont été décrites taxonomiquement (Hibbett et al. 2016; Knowles et al. 2022). Parmi les Fungi étudiés, la proportion de ceux dont les métabolites secondaires sont connus est estimée à 7 % (Bills, Gloer 2017). Aussi, avec plus de 90 % de Fungi non connus, et une majorité écrasante de métabolites secondaires à découvrir, les Fungi représentent une source particulièrement attrayante de diversité métabolique (Knowles et al. 2022).

Les Fungi sont des microorganismes privilégiés dans la lutte contre les pathogènes fongiques. Ils ont en effet la capacité de produire une grande diversité de métabolites secondaires et d'enzymes lytiques pour interagir avec leur environnement, dont d'autres Fungi peuvent faire partie. De plus, bien que beaucoup de Fungi soient des pathogènes de plantes ou humains, une grande partie d'entre eux, dont les levures, sont impliqués dans des processus de fermentation comme la fabrication du pain, d'alcools, de fromage ou de sauce soja par exemple (Nout, Aidoo 2011). Cela fait de ces Fungi des microorganismes d'intérêt car ils ne présentent pas de toxicité pour les humains.

5.1.1 *Trichoderma*

a. Généralités sur *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* appartient à la division des ascomycètes et à la famille des *Hypocreaceae* (Esposito, Silva 1998). Ses espèces se présentent sous la forme caractéristique de colonies à la croissance rapide, de couleur initiale blanche ou hyaline et verdissant avec le temps (Figure 7). En outre, ces colonies ont un aspect floculant ou touffu et compact (Rifai 1969). Ce champignon est ubiquiste, et se retrouve dans quasiment tous les types de sols et dans des habitats naturels contenant de la matière organique. Aussi, il est endophyte en surface et dans les racines des plantes (Bailey et al. 2008), mais également sur le bois en décomposition (Esposito, Silva 1998). Son potentiel d'agent de biocontrôle a été décrit pour la première fois dans les années 1930, où il est rapporté que *Trichoderma* a parasité un certain nombre de pathogènes fongiques, dont *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium* spp., *Rhizopus* spp. et *Sclerotium rolfsii* (Weindling 1932).

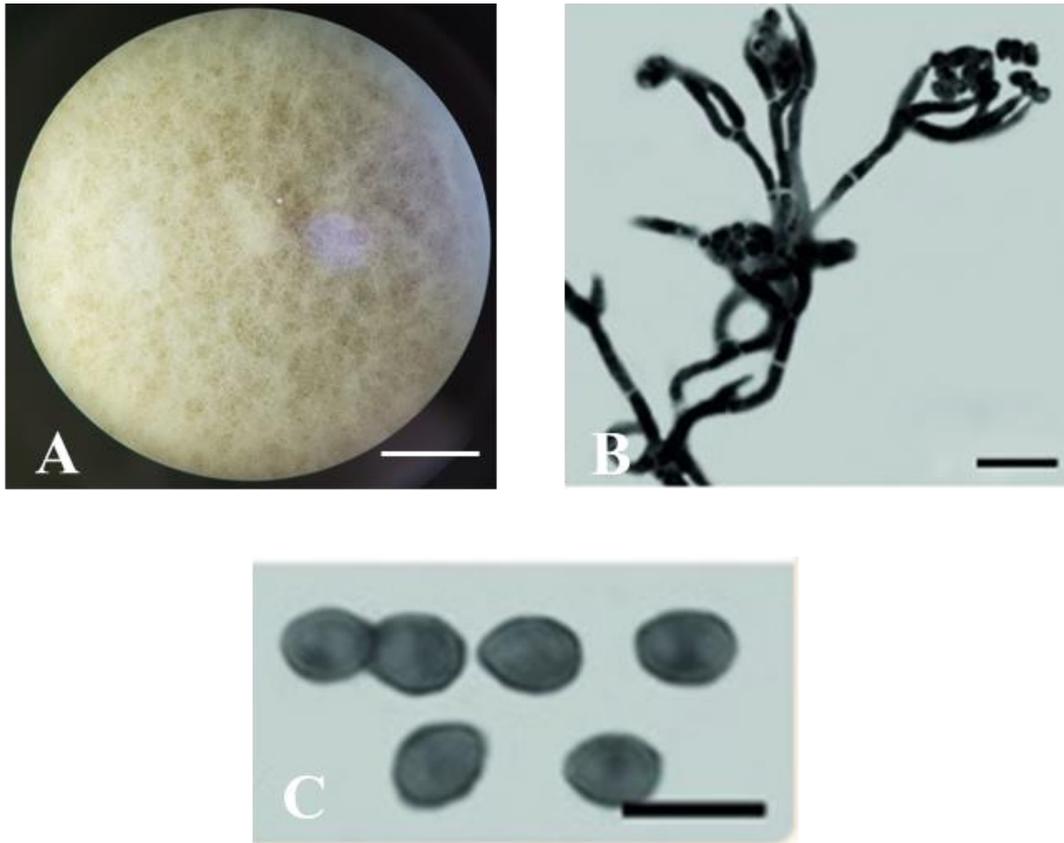


Figure 7 : A) Prise de vue d'une colonie de *Trichoderma harzianum* sur PDA, échelle 1,5 mm ; B) Conidiophores de *Trichoderma rosulatum* après 40 jours de croissance, échelle 10 μm ; C) Conidies de *Trichoderma rosulatum*, échelle 5 μm (B, C : Zhu, Zhuang 2015).

b. Biocontrôle par Trichoderma

Les mécanismes impliqués dans le biocontrôle par *Trichoderma* sont variés, et font de lui un agent de biocontrôle particulièrement attrayant. Ces derniers incluent le mycoparasitisme, l'antibiose, la compétition pour les nutriments, l'induction des défenses et la promotion de la croissance de la plante (Howell 2003).

Le mycoparasitisme, par définition, est un mécanisme d'antagonisme direct entre un champignon et un pathogène fongique ; l'endophyte pénètre dans le pathogène qui lui sert alors de source de nutriments (Jeffries 1995). Ce mycoparasitisme peut concerner des champignons vivants ; dans ce cas, le parasite utilise la cible vivante comme vecteur de nutriments dans une situation de biotrophie, mais il peut également se dérouler dans un contexte de nécrotrophie. Dans ce cas, le parasite se nourrit des restes du champignon. *Trichoderma*, en tant que mycoparasite, peut produire un panel d'enzymes de dégradation, telles que les chitinases, les β -

1,3-glucanases et les protéases, qui permettent de dégrader la paroi des champignons (Markovich, Kononova 2003).

Ce champignon produit également des métabolites secondaires impliqués dans l'antibiose, donc à effet antibiotique. Un grand nombre de ces métabolites ont été décrits dans la littérature (Vinale et al. 2014; Reino et al. 2008). Ils peuvent être classés en trois catégories : les antibiotiques volatiles, les composés solubles dans l'eau et les peptaibols (Ghisalberti, Sivasithamparam 1991). Parmi les antibiotiques volatiles, il existe par exemple la 6-pentyl- α -pyrone (6PP), qui est décrite comme ayant une activité antifongique contre un grand nombre de phytopathogènes fongiques dont *Botrytis cinerea*, et *Fusarium moniliforme* (Degani et al. 2021; Pezet et al. 1999; El-Hasan et al. 2007). Elle joue un rôle dans l'inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des spores (Scarselletti, Faull 1994). Les koninginines sont un autre type de métabolites secondaires découvert chez *Trichoderma koningii* (Cutler et al. 1989). Plusieurs koninginines sont connues comme ayant une activité antifongique, comme la koninginine D, qui est capable d'inhiber notamment la croissance de *F. oxysporum*, *R. solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Dunlop et al. 1989). Les peptaibols quant à eux sont des NRP (peptides non ribosomiques) linéaires ayant une activité antibactérienne et antifongique (S. Daniel, Filho 2007; Szekeres et al. 2005). Ils peuvent induire une mort programmée des cellules chez des pathogènes fongiques (Shi et al. 2012) ainsi que la résistance systémique chez les plantes. Trois peptaibols isolés de *Trichoderma koningii*, des trichokonines, ont ainsi montré une activité antimicrobienne contre plusieurs pathogènes, dont plusieurs *formae speciales* de *F. oxysporum*, *B. cinerea*, et *R. solani* et plusieurs bactéries à Gram positif (Xiao-Yan et al. 2006). Une grande diversité de métabolites secondaires possédant des activités antifongiques, tels que des lactones, des stéroïdes ou encore des trichothécènes sont aussi produits par *Trichoderma* (Khan et al. 2020).

Trichoderma a également une activité de compétition avec les champignons phytopathogènes, et produit à cet effet des sidérophores, par exemple, comme l'acide harzianique, afin de chélater le fer du sol (Vinale et al. 2013). Ces molécules peuvent aussi avoir des activités antifongiques (Vinale et al. 2009).

Enfin, *Trichoderma* a une action élicitrice des défenses de la plante via l'induction de l'accumulation dans la plante de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Palmieri et al. 2012), et la modification de l'expression des gènes impliqués dans la défense des plantes (Perazzolli et al. 2011). Il promeut aussi la croissance de la plante en modifiant ses profils hormonaux et en induisant la production de protéines impliquées par exemple dans la photosynthèse (Harman et

al. 2004). De plus, certaines molécules produites par *Trichoderma* qui ont des effets antibiotiques présentent également des effets bénéfiques pour les plantes, comme l'harzianolide, produit par *Trichoderma harzianum*, qui a augmenté le taux de croissance de jeunes plants de tomates d'un facteur 2,5 après une application à 0,1 ppm (Cai et al. 2013).

c. Produits de biocontrôle dérivés de *Trichoderma*

En France, un grand nombre de produits de biocontrôle impliquant des souches de *Trichoderma* existent sur le marché, et sont composés d'espèces comme *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. gamsii* et *T. harzianum* (Tableau 2).

Tableau 2 : Antifongiques commerciaux de biocontrôle dérivés de *Trichoderma* autorisés en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022). Seuls les produits phytopharmaceutiques de référence sont représentés.

Nom commercial	Substance active (souche)	Pathogène cible
BLINDAR	<i>Trichoderma asperellum</i> ICC012 <i>Trichoderma gamsii</i> ICC080	<i>Armillaria</i> , champignons (pythiacées), esca et black dead arm, maladies fongiques, pourridiés
XEDAVIR	<i>Trichoderma asperellum</i> ICC012 <i>Trichoderma asperellum</i> T25 <i>Trichoderma asperellum</i> TV1	Champignons autres que pythiacées, champignons (pythiacées), <i>Verticillium</i>
T34 Biocontrol	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i>
ESQUIVE WP	<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	Black dead arm, esca, eutypiose
TRI-SOIL	<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	Champignons autres que pythiacées (<i>Fusarium foetens</i>), champignons (pythiacées), maladies des taches brunes (<i>Rhizoctonia</i> spp.)
TRI-WALL	<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	Esca, black dead arm
VINTEC	<i>Trichoderma atroviride</i> SC1	Black dead arm, esca, eutypiose, pourriture grise
TUSAL	<i>Trichoderma atroviride</i> T11 <i>Trichoderma asperellum</i> T25	Champignons (autres que pythiacées), champignons (pythiacées)

TRIANUM-G	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T22 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai ITEM-908	Champignons autres que pythiacées, champignons (pythiacées), maladies fongiques
TRIANUM-P	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T22 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai ITEM-908	Champignons autres que pythiacées, champignons (pythiacées), maladies fongiques

d. Co-cultures impliquant *Trichoderma* pour le biocontrôle

Trichoderma étant un genre producteur d'un grand nombre d'enzymes et de métabolites secondaires d'intérêt et étant connu pour son antagonisme envers les champignons pathogènes, il est souvent étudié dans le cadre de co-cultures.

La co-culture de *Trichoderma* avec des champignons est courante, notamment pour la production d'enzymes lytiques spécifiques de la dégradation de substrats solides ligneux (Sperandio, Filho 2021). Ces cocktails enzymatiques sont souvent utilisés pour la production de sources d'énergie comme l'éthanol et le glucose à partir de biomasses lignocellulosiques (Chen et al. 2019). La mesure des activités enzymes lignocellulolytiques dans une co-culture en milieu submergé d'une souche recombinante de *Trichoderma reesei* et d'une souche naturelle d'*Aspergillus niger*, a montré une augmentation de 10 % de l'activité cellobiohydrolase, 40 % pour l'endoglucanase, et 739 % pour la β -glucanase, par rapport à l'activité enzymatique détectée chez *T. reesei* seul (Zhao et al. 2018). La co-culture fongique de *Trichoderma* avec des pathogènes est un moyen d'identification de nouveaux agents de biocontrôle ; une souche de *Trichoderma asperellum* isolée d'un sol rhizosphérique a ainsi pu inhiber la croissance et la germination de spores de plusieurs *Fusarium* phytopathogènes par la production d'enzymes lytiques (chitinases et β -1,3,glucanase) (Win et al. 2021).

Trichoderma est également décrit dans des co-cultures avec des bactéries, en particulier appartenant au genre *Bacillus*. La co-culture de *Trichoderma asperellum* et *Bacillus amyloliquefaciens* a induit la surexpression de gènes liés à la sporulation, les métabolites secondaires, le mycoparasitisme, les enzymes et les antioxydants chez *Trichoderma asperellum* (Karupiah et al. 2019). L'optimisation de la co-culture entre *Trichoderma atroviride* et *Bacillus subtilis*, pour que les deux partenaires puissent se développer, a quant à elle permis une production différentielle de métabolites par rapport aux monocultures, et le filtrat de culture a montré une activité antifongique contre *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium*

graminearum (Li et al. 2020). Des résidus de maïs ont été fermentés par une co-culture de *Trichoderma harzianum* et *Pseudomonas fluorescens*, et appliqués comme protection de grain de maïs, ce qui a conduit à la réduction de jusqu'à 80 % de l'incidence des maladies racinaires durant la croissance du maïs, contre 60 % en présence d'un antifongique de synthèse (Atalla et al. 2020).

5.1.2 *Aspergillus*

a. Généralités sur *Aspergillus*

Aspergillus est un autre genre de champignons appartenant également aux ascomycètes, et membre de la famille des *Trichocomaceae* et parmi ceux-ci des *Aspergillaceae* (Houbraken, Samson 2011). Il est présent dans une grande diversité d'habitats, comme les sols, les plantes vivantes comme les résidus végétaux mais aussi les habitats marins. Bien que ce genre soit principalement connu à cause de ses espèces pathogènes comme *Aspergillus fumigatus* ou encore *Aspergillus flavus* et sa production de mycotoxines – comme les aflatoxines – il a une importance dans beaucoup de procédés de fermentation alimentaire, même ancestraux, et nombre de ses espèces sont utilisées en biotechnologie pour la production d'antibiotiques, d'acides organiques ou d'enzymes (Samson et al. 2014).

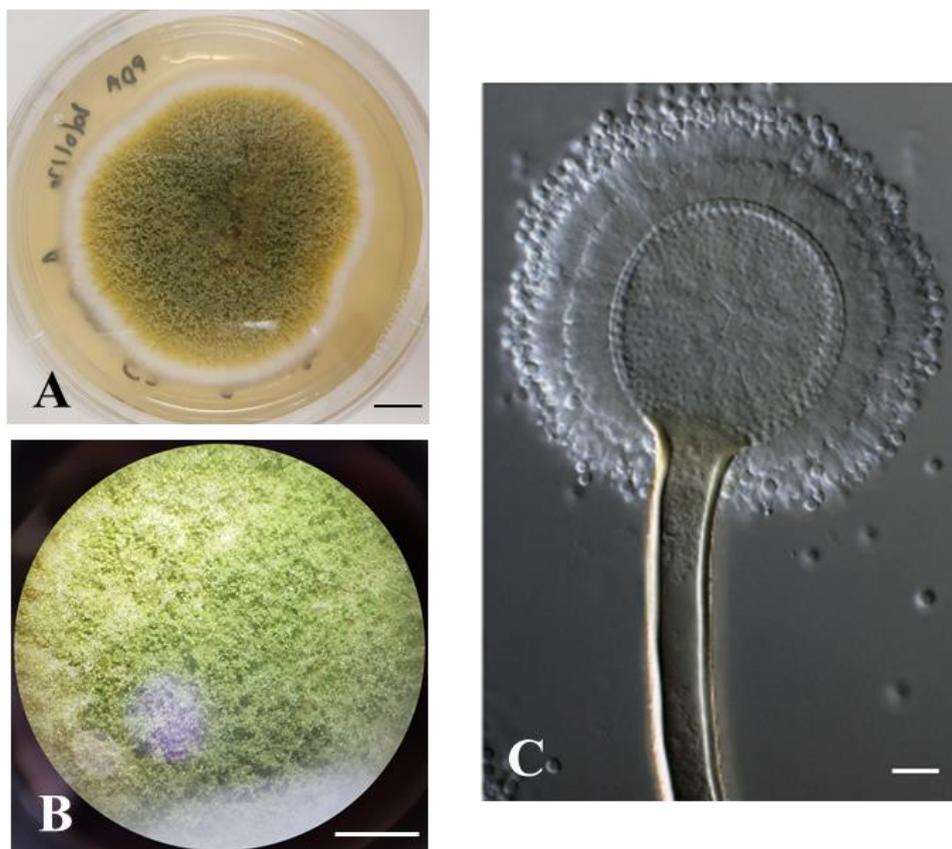


Figure 8 : **A)** Prise de vue d'une colonie d'*Aspergillus oryzae* sur PDA, échelle 1 cm ; **B)** Prise de vue d'une colonie d'*Aspergillus oryzae* sur PDA, échelle 1,5 mm ; **C)** Conidiophore d'*Aspergillus ochraceus*, échelle 10 μm (Samson et al. 2014).

Le genre *Aspergillus* peut se reconnaître généralement grâce à ses conidiophores (Figure 8C), qui ont une forme caractéristique avec de grands stipes à paroi épaisse se terminant en une vésicule gonflée sur laquelle se développent les conidies (Pitt, Hocking 1985). Le développement mycélien des espèces d'*Aspergillus* diffère notamment par les couleurs observables et peut aider à l'identification : *Aspergillus niger* est de teinte noire, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* tendent vers le vert et *Aspergillus candidus* se présente sous la forme de colonies blanches. Cependant, comme pour tout microorganisme, l'identification morphologique n'est pas suffisante, et ces critères ne sont pas toujours fiables, et l'identification basée sur les séquences est à utiliser (Samson et al. 2007).

b. Biocontrôle par *Aspergillus*

De par sa nature de pathogène de beaucoup de ses espèces, le biocontrôle contre *Aspergillus* est très étudié. C'est le cas pour *Aspergillus niger*, cause de pourriture noire chez plusieurs végétaux, dont le biocontrôle par *Trichoderma* a montré jusqu'à 86,2 % d'inhibition du

champignon (Gajera et al. 2011). De même, des champignons phytopathogènes producteurs de mycotoxines comme *Aspergillus flavus* et ses sous-espèces (Gourama, Bullerman 1995) font l'objet d'études de biocontrôle pour l'inhibition de leur croissance et de leur production d'aflatoxines (Reddy et al. 2009).

Cependant, des souches non aflatoxinogènes d'*Aspergillus flavus* sont également utilisées dans la lutte contre la production d'aflatoxines par ces pathogènes. Ces souches permettent non seulement une croissance diminuée du pathogène (Khan et al. 2021) mais aussi réduisent la production d'aflatoxine (Ehrlich 1987). Une application au champ de souches non toxigènes d'*Aspergillus flavus* a résulté en une baisse de la concentration en aflatoxines dans le maïs, et une augmentation de la colonisation des plantes par ces espèces par rapport à celles productrices d'aflatoxines (Dorner 2009). Ces souches entrent en compétition pour les nutriments lorsqu'elles sont mises en présence l'une de l'autre (Cotty et al. 2007; Probst et al. 2011). En outre, l'effet antagoniste des souches AF⁻ (non productrice d'aflatoxines) pourrait également être lié à la production de composés organiques volatiles tels que le 3-octanone, le 2,3-dihydrofurane, ou décane, qui ont tous conduit à l'inhibition de la production d'aflatoxines par les souches AF⁺ (Moore et al. 2021). Un autre mécanisme impliqué dans l'inhibition de la production de ces mycotoxines pourrait se mettre en place à travers un contact entre le pathogène et son antagoniste (Damann Jr. 2015). Une espèce non toxigène d'*Aspergillus oryzae*, très proche d'*Aspergillus flavus* phylogénétiquement (Chang 2019) et mise en œuvre dans la fermentation alimentaire du soja, est aussi utilisée dans le biocontrôle d'*Aspergillus flavus* (Alshannaq et al. 2018).

Par ailleurs, la production de composés antibactériens et antifongiques dérivés de pyranone a été montrée chez *Aspergillus candidus* (Elaasser et al. 2011). La fermentation de riz par ce champignon a conduit à la production de métabolites dont la terphénylline possédant une activité antioxydante (Yen et al. 2003). *Aspergillus* est également connu pour sa large production d'enzymes lytiques, pouvant dégrader des polysaccharides de paroi végétale, dont des endoglucanases, β -glucosidases, cellobiohydrolases (Tsang et al. 2009; de Vries, Visser 2001). Ces enzymes sont utilisées dans des processus industriels (Cologna et al. 2018), et dans le biocontrôle de champignons phytopathogènes. Une β -glucanase issue d'*Aspergillus niger* a ainsi montré une activité inhibitrice contre *Fusarium oxysporum* et *Penicillium digitatum* (El-Shora et al. 2021). Le potentiel de biocontrôle de plusieurs espèces d'*Aspergillus* a été testé contre *Macrophomina phaseolina*. Lors de cette étude, *Aspergillus flavipes* s'est révélé être le plus performant et une analyse GC-MS de ses productions a permis de mettre en évidence la

synthèse de plusieurs métabolites connus pour des activités antimicrobiennes, dont le décane, l'undécane, ou encore le 1-nonadécène (Khan, Javaid 2021). La combinaison de plusieurs espèces d'*Aspergillus* endophytes isolés de feuilles de Moringa (*Aspergillus alabamensis*, *Aspergillus tubingensis* et *Aspergillus oryzae*) a conduit à l'inhibition du développement de *Fusarium oxysporum* sur des plants de tomates, une réduction de l'incidence de la maladie allant jusqu'à plus de 85 %, et une meilleure croissance de la plante, en comparaison avec les témoins non inoculés avec *Aspergillus* (Aldinary et al. 2021).

Dans le biocontrôle en France, aucun produit dérivé d'*Aspergillus* n'existe sur le marché. Cependant, à l'international, certains BCA dérivés d'*Aspergillus flavus* non toxigène existent (Dorner, Lamb 2006).

c. Co-cultures impliquant *Aspergillus*

Comme cela a été discuté dans la partie précédente, des co-cultures de souches AF⁻ et AF⁺ montrent l'inhibition de la production d'aflatoxines voire l'inhibition de la croissance des souches AF⁺, et une domination des souches AF⁻. Des co-cultures avec d'autres champignons, comme *Trichoderma*, ont été menées afin d'induire la production d'enzymes lytiques par ce dernier, ou par *Aspergillus* lui-même (Sperandio, Filho 2021). Le potentiel de biocontrôle d'*Aspergillus* est également exploité à travers des co-cultures avec des champignons phytopathogènes (Khan, Javaid 2021).

Des co-cultures entre *Aspergillus* et des bactéries ont également été entreprises. La co-culture d'*Aspergillus versicolor* avec *Bacillus subtilis* a permis la synthèse de huit métabolites cryptiques non produits dans les monocultures respectives (Abdelwahab et al. 2018). L'interaction rapprochée entre *Aspergillus nidulans* et plusieurs actinomycètes isolés du sol a mené à la découverte de la production *de novo* de polykétides aromatiques par *Aspergillus nidulans* en la présence de *Streptomyces hygroscopicus*, uniquement quand les deux microorganismes pouvaient physiquement interagir (Schroeckh et al. 2009). La co-culture d'*Aspergillus flavipes* avec *Streptomyces* sp. a stimulé la production par *A. flavipes* de cytochalasans, qui présentent une activité antibactérienne et ont inhibé la croissance de *Streptomyces* sp., et dont la production dépendait là encore du contact physique entre les deux partenaires de co-culture (Yu et al. 2016).

La co-culture n'induit pas nécessairement des productions *de novo* de métabolites secondaires : en co-cultivant *Aspergillus terreus* et *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus*, il a été possible d'induire la production de dérivés de butyrolactone par *Aspergillus terreus*, dont certains ont

montré une faible activité antibactérienne contre *Bacillus cereus*. La co-culture d'*Aspergillus terreus* et *Streptomyces coelicolor* ou *Streptomyces lividans* n'a par contre pas provoqué la synthèse de nouveaux métabolites secondaires (Chen et al. 2015).

5.1.3 Autres exemples de champignons

Un grand nombre de champignons présentent un intérêt dans la lutte contre les pathogènes fongiques et/ou dans la production de métabolites d'intérêt. Parmi ceux-ci, les champignons existant dans les écosystèmes proches des plantes peuvent être considérés, notamment les endophytes ou les épiphytes et plus largement les champignons de la rhizosphère. Dans les parties précédentes, les genres étudiés *Trichoderma* et *Aspergillus*, répandus dans toutes sortes d'habitats, contiennent tous les deux des espèces endophytes qui sont utilisées en biocontrôle.

Les microorganismes endophytes, dont certains champignons font partie, se définissent par un cycle de vie dont tout ou une partie se déroule à l'intérieur des tissus d'une plante. Ces microorganismes peuvent avoir une relation neutre ou bénéfique avec leur hôte végétal (Backman, Sikora 2008). Les épiphytes se développent et vivent à la surface des plantes, et peuvent être éliminés par lavage de la surface végétale ou par sa stérilisation - au contraire des endophytes (Santamaría, Bayman 2005). Les endophytes et les épiphytes représentent une diversité d'activités et de mécanismes d'intérêt dans la protection des plantes.

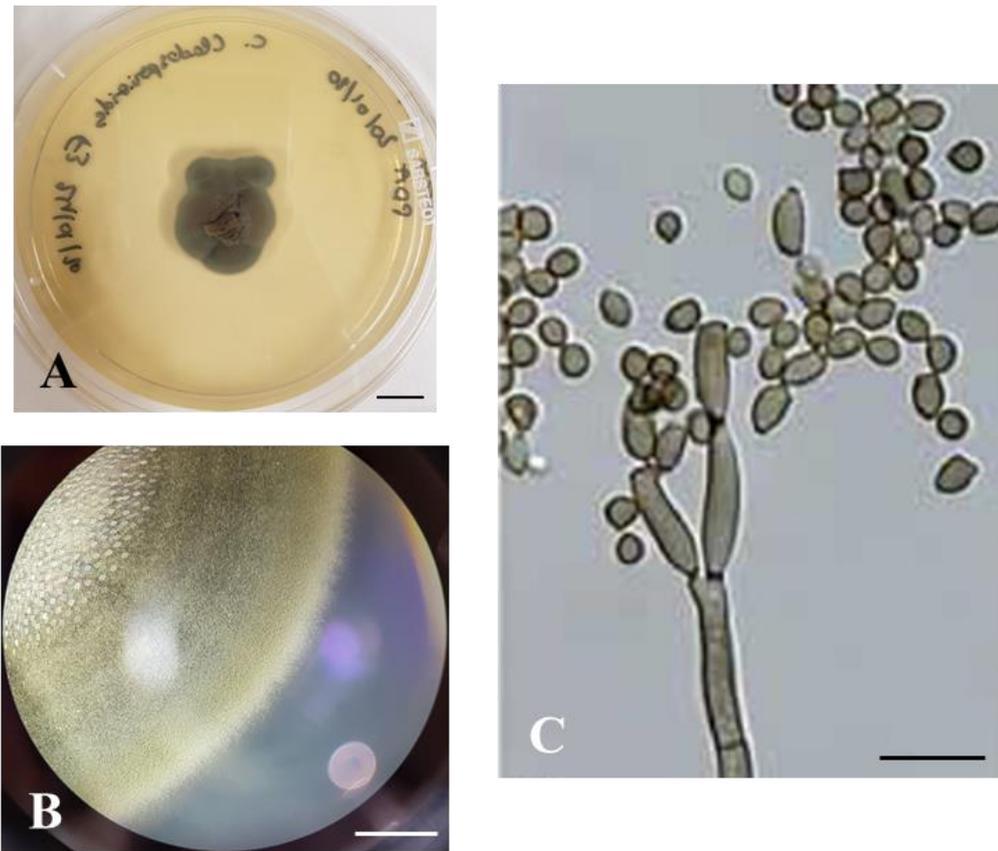


Figure 9 : **A)** Prise de vue d'une colonie de *Cladosporium cladosporioides* sur PDA, échelle 1 cm ; **B)** Prise de vue d'une colonie de *Cladosporium cladosporioides* sur PDA, échelle 1,5 mm ; **C)** Conidiophores et chaîne de conidies de *Cladosporium aphidis* *in vitro*, échelle 10 μ m (Bensch et al. 2012).

Cladosporium est un ascomycète, appartenant à la famille des *Davidiellaceae*. Il est reconnaissable par son mycélium d'aspect vert à brun/noir et des conidies allongées (Figure 9). Le genre est cosmopolite et se retrouve dans les sols, les plantes et résidus végétaux. De nombreuses espèces de *Cladosporium* sont communément des endophytes ou des phylloplanes (Bensch et al. 2012). *Cladosporium* n'est pas un agent pathogène pour l'être humain, cependant il peut causer des allergies respiratoires. Certaines de ses espèces sont des pathogènes de plantes (Schubert 2005), mais *Cladosporium* est aussi étudié pour sa production de métabolites, notamment à activité antimicrobienne (Wang, et al. 2016).

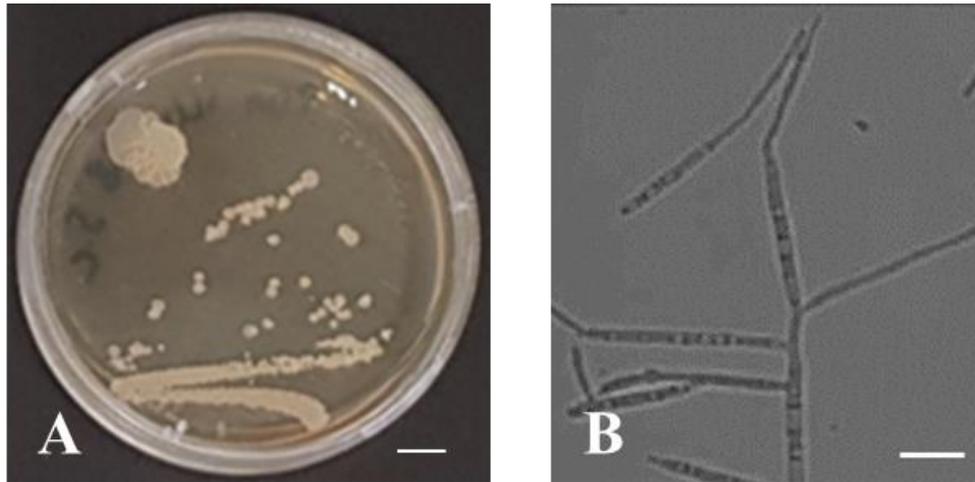


Figure 10 : **A)** Prise de vue d'un étalement de *Pseudozyma aphidis* DSM 1247 sur NB, échelle 5 mm ; **B)** Morphologie de *Pseudozyma aphidis* en culture liquide YM à 30 °C, échelle 10 μm (Kitamoto 2019).

Le genre *Pseudozyma* regroupait auparavant des champignons causant des maladies du charbon. Ces champignons sont des basidiomycètes, appartenant à la sous-division des *Ustilaginomycotina*. *Pseudozyma* en particulier appartient à l'ordre des *Ustilaginales*. Il présente une croissance similaire à celle des levures et peut développer des pseudohyphes (Figure 10). Comme cela a été susmentionné, *Pseudozyma* est un phytopathogène, et peut également être un pathogène opportuniste de l'Homme. Le genre *Pseudozyma*, dont de nombreuses espèces sont épiphytes, a connu une reclassification en 2015 (Wang et al. 2015) : certaines espèces ont été transférées dans le genre *Ustilago*, d'autres dans le genre *Moesziomyces*, *Triodiomyces*, *Sporisorium* ou encore *Langdonia*. Cependant, des publications parues après 2015 utilisent encore le nom *Pseudozyma*, avec une éventuelle mention de la nouvelle classification (Srivastava et al. 2021).

a. Exemples d'utilisation en biocontrôle

Les microorganismes se développant à proximité, à la surface, ou à l'intérieur des plantes présentent un certain nombre de modes d'action exploitables dans la protection des plantes et dans le biocontrôle : la compétition, le parasitisme, l'antibiose et l'induction des défenses de la plante ainsi que la promotion de sa croissance. Toutes ces interactions existent dans la nature au sein de consortia complexes (Whipps 2001; Porrás-Alfaro, Bayman 2011; Srivastava et al. 2021). Aussi, un certain nombre de champignons existant dans ces écosystèmes ont été étudiés pour leur potentiel de biocontrôle et leur activité antifongique notamment.

Les endophytes par exemple peuvent protéger les plantes via un certain nombre d'actions : la stimulation de la croissance des plantes (avec la production d'analogues d'hormones régulatrices de croissance et de composés volatils qui stimulent la croissance), l'induction de mécanismes de défense des plantes (production d'éliciteurs qui induisent l'expression de gènes impliqués dans les voies de défense), la sécrétion d'enzymes qui dégradent les polysaccharides (comme les chitinases, les glucanases, les protéases et les cellulases), la production d'antibiotiques, le développement de biofilms, la compétition pour les nutriments et l'inactivation des phytotoxines de l'agent pathogène (O'Brien 2017).

Le potentiel antifongique de l'endophyte *Cladosporium cladosporioides* a été testé contre différents pathogènes fongiques et comparé à des fongicides du commerce. Différents métabolites ont été extraits et identifiés dont la cladosporine et des dérivés. La cladosporine a montré une aptitude à l'inhibition de croissance entre 90,1 et 92,7 % pour différentes espèces de *Colletotrichum* (Wang et al. 2013), efficacité supérieure à celle de l'azoxystrobine (fongicide de synthèse) à la même concentration de 30 μ M. De même, des champignons endophytes et de la rhizosphère ont été isolés de vignes et ont démontré une activité remarquable contre plusieurs pathogènes fongiques causant des maladies du bois de la vigne : *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* et *Phaeoconiella chlamydospora*. Parmi ces champignons, plusieurs souches de *Clonostachys rosea* ont montré les inhibitions les plus importantes ; cette activité est due à du mycoparasitisme et la sécrétion de métabolites inhibant la croissance de ceux-ci (Silva-Valderrama et al. 2021).

Dans une campagne d'isolement réalisée sur la flore épiphytique de grains de raisins, six souches de levures ont été retenues pour leur activité inhibitrice sur *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger* (Bleve et al. 2006). Certaines souches, dont *Issatchenkia terricola*, ont totalement inhibé la croissance de ces pathogènes dans un test de compétition pour les nutriments. *Pseudozyma*, pris dans le sens pré-2015, est un genre connu et étudié pour sa production de métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne. *Pseudozyma flocculosa* (syn. *Anthracozytis flocculosa*), par exemple, produit un glycolipide possédant une activité antifongique, la flocculosine (Mimee et al. 2005). Outre la production de molécules ayant une activité antifongique, les extraits de *Pseudozyma aphidis* (syn. *Moesziomyces aphidis*) possèdent un pouvoir anti-germinatif et inhibiteur de croissance sur certains phytopathogènes, comme *Botrytis cinerea* et *Alternaria brassicicola* (Buxdorf et al. 2013).

b. Exemples de co-cultures impliquant d'autres champignons

L'étude des co-cultures entre champignons endophytes est elle aussi une source de nouveaux métabolites actifs. Cette voie de découverte est cependant encore nouvelle et peu de co-cultures entre champignons endophytes sont décrites (Knowles et al. 2022). La co-culture sur boîte des endophytes *Alternaria tenuissima* et *Nigrospora sphaerica* a conduit à la production de polykétides antifongiques dont le stemphyperylénol par *A. tenuissima*, inhibant la croissance de *N. sphaerica*. En outre, ces composés n'ont eu aucun effet phytotoxique pour les cellules de l'hôte d'*A. tenuissima* (*Smallanthus sonchifolius*) (Chagas et al. 2013). *Nigrospora oryzae* et *Beauveria bassiana*, tous deux endophytes de *Dendrobium officinale*, ont été co-cultivés en milieu liquide pour examiner la diversité potentielle des métabolites produits. Ainsi, cinq nouvelles azaphilones dont une présentant une activité antimicrobienne sélective contre *Beauveria bassiana* et *B. subtilis* ont été isolées et identifiées (Zhang et al. 2018).

Les champignons endophytes sont également étudiés dans le cadre de co-cultures avec des bactéries. La co-culture d'un champignon endophyte de *Sapium ellipticum*, *Chaetomium* sp. avec *Bacillus subtilis* a conduit à l'augmentation de la production de métabolites déjà présents mais aussi à la production *de novo* de sept métabolites connus et cinq nouvelles molécules. Un des composés uniquement présents dans la co-culture a montré une activité antibactérienne faible contre *B. subtilis* (Akone et al. 2016). De même, la co-culture de l'endophyte *Fusarium tricinctum* avec *Streptomyces lividans* a conduit à la production par *F. tricinctum* de plusieurs composés cryptiques non présents dans les cultures axéniques, dont des nouveaux dimères de naphthoquinones et dérivés de latéropyrone, mais aussi des composés connus dont la mycotoxine zéaralénone. Plusieurs composés antibiotiques dont la latéropyrone, des depsipeptides et un lipopeptide ont été produits en plus grande quantité (Moussa et al. 2019).

5.2 Bactéries

Les bactéries sont une véritable ressource de molécules à applications variées. Elles se retrouvent dans toutes sortes d'habitats, sur terre, dans l'eau, dans les sols, à l'interface et à l'intérieur des êtres vivants, dont les plantes et les humains. Elles produisent un grand nombre de métabolites leur permettant d'interagir avec leur environnement, mais qui sont aussi d'intérêt pour les humains : des enzymes lytiques, une grande variété de métabolites secondaires possédant des activités biologiques comme des antibiotiques, des lipopeptides ou des sidérophores (Keswani et al. 2020).

Une grande partie des bactéries étudiées pour leur activité bénéfique sur les plantes, dont leur antagonisme envers des phytopathogènes fongiques, sont les PGPR. Ces bactéries, se développant dans la rhizosphère, peuvent coloniser celle-ci, la surface de la racine ou rhizoplane, et la racine elle-même (Gray, Smith 2005). Un grand nombre de genres ont été identifiés comme étant des PGPR, mais *Bacillus* et *Pseudomonas* en représentent la majorité (Podile, Kishore 2006). Parmi les autres genres significativement importants dans la synthèse de métabolites secondaires d'intérêt se retrouvent *Streptomyces* et les actinomycètes en général qui peuvent aussi être des PGPR, et dont les métabolites trouvent des applications historiques en médecine mais également dans le biocontrôle (Viaene et al. 2016). Les bactéries lactiques (LAB) dont le genre *Lactobacillus*, impliquées dans des fermentations ont également un intérêt dans la protection des plantes contre des pathogènes fongiques dont des producteurs de mycotoxines, tels qu'*A. flavus*, *A. fumigatus*, *P. expansum* ou *F. culmorum* (Linares-Morales et al. 2018).

5.2.1 *Bacillus*

a. Généralités sur *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à l'embranchement des *Firmicutes* et à la famille des *Bacillaceae*. Ce sont des bactéries à Gram positif, qui se présentent sous la forme de bacilles. *Bacillus* a la caractéristique particulière de produire des endospores lorsqu'il est soumis à des conditions défavorables (Zeigler, Perkins 2009). Il se caractérise par des cellules allongées, souvent motiles (Figure 11). *Bacillus subtilis* est l'espèce modèle du genre *Bacillus*, et a été décrit dès la fin du 19^e siècle (Cohn 1872). Le genre *Bacillus* se retrouve dans des environnements et habitats variés, comme les sols, les milieux aquatiques, les végétaux, la nourriture ou le système gastrointestinal d'animaux et d'insectes (Nicholson 2002). Bien que le genre regroupe certains pathogènes humains (*Bacillus anthracis* ou *Bacillus cereus*) (Kolstø et al. 2009), plusieurs espèces de *Bacillus* sont des PGPR. De ce fait *Bacillus* est étudié pour son activité antimicrobienne, notamment antifongique, dans la lutte contre les phytopathogènes.

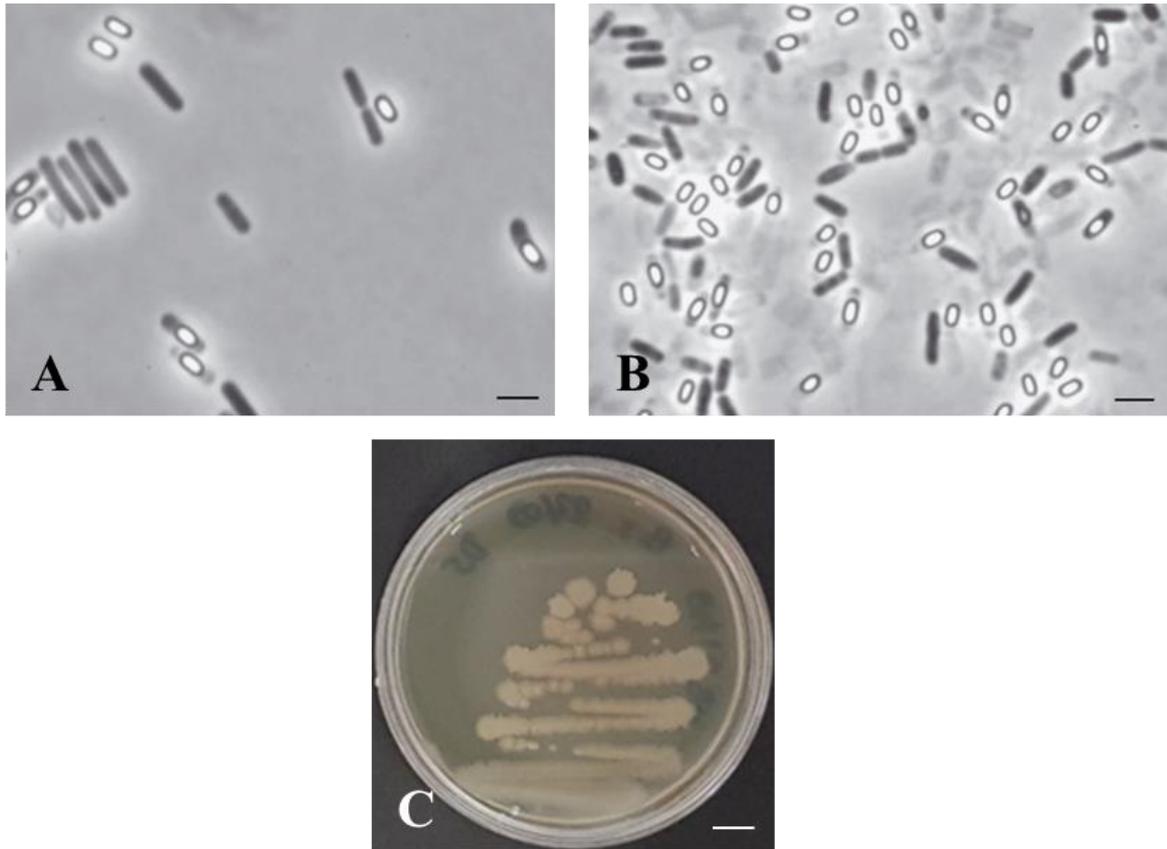


Figure 11 : A) Cellules de *Bacillus subtilis*, échelle 2 µm ; B) Cellules de *Bacillus licheniformis*, échelle 2 µm (A, B : Logan, Vos 2015) ; C) Prise de vue d'un étalement de *Bacillus subtilis* sur NB, échelle 5 mm.

b. Utilisation de Bacillus en biocontrôle

L'activité biologique de *Bacillus* est permise par la production de métabolites secondaires qui peuvent attaquer les pathogènes et entrer en compétition avec eux, mais aussi qui peuvent stimuler la croissance et les défenses des plantes. Dans ces composés se retrouvent des lipopeptides, antibiotiques, COV, bactériocines, sidérophores et polykétides (Stein 2005; Ongena, Jacques 2008; Kai et al. 2009; Bharucha et al. 2013).

Les lipopeptides sont des peptides non ribosomiques (NRP) synthétisés par des NRPS (enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques) (Ongena, Jacques 2008). Parmi ces molécules, les surfactines, les iturines et les fengycines sont très bien décrites pour leurs activités. Ces molécules sont impliquées dans la formation de biofilms par *Bacillus*, dans la signalisation pour les cellules de plantes, mais aussi dans des activités antifongiques et antibactériennes (Penha et al. 2020). L'activité antifongique contre des champignons phytopathogènes, notamment *Gaeumannomyces graminis*, de souches de *Bacillus* isolées de sol rhizosphérique a été testée et

reliée à la production notamment de lipopeptides appartenant aux familles de l'iturine, la fengycine et la surfactine (Yang et al. 2018). Les lipopeptides appartenant à cette famille ont déjà montré une efficacité contre un grand nombre de champignons phytopathogènes, dont *A. flavus*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp. ou encore *Alternaria alternata* avec une réduction de la croissance mycélienne et des symptômes de nécrose sur fruit (Dimkić et al. 2013). La surfactine possède des propriétés surfactantes et intervient principalement dans la formation de biofilms par *Bacillus* et dans l'induction de résistance chez les plantes (Ongena, Jacques 2008). Elle améliore également l'activité antifongique de l'iturine en favorisant son absorption et sa dispersion (Maget-Dana et al. 1992). Les iturines et les fengycines sont celles impliquées dans l'activité antagoniste que *Bacillus* peut démontrer, en induisant la réponse de défense des plantes et leur résistance systémique (Ongena et al. 2007), mais aussi en interagissant avec les composants de la membrane des champignons et en y formant des pores (Deleu et al. 2005; Maget-Dana, Peypoux 1994).

Les bactériocines sont d'autres molécules biologiquement actives produites par *Bacillus*, dont la plupart appartiennent au groupe des lantibiotiques, des peptides modifiés post-traduction et contenant de la lanthionine (Abriouel et al. 2011). La subtiline et la nisine, tous deux des lantibiotiques proches structurellement, présentent une activité antimicrobienne notamment contre un large spectre de bactéries à Gram positif. Ces bactériocines forment des pores dans la membrane cellulaire de leurs cibles (Parisot et al. 2008; Breukink et al. 1999; Kordel, Schüller, Sahl 1989). L'amylocyclicine, produite par *Bacillus amyloliquefaciens*, présente par exemple des activités antibactériennes contre des bactéries à Gram positif, dont plusieurs appartenant au genre *Bacillus*, mais pas contre des bactéries à Gram négatif (Scholz et al. 2014). Les sidérophores produits par *Bacillus*, comme ceux produits par *Trichoderma*, interviennent dans la compétition pour les nutriments ; ainsi la production par *Bacillus subtilis* d'un sidérophore a conduit à la réduction de l'incidence de fusariose vasculaire sur des plants de poivre et a également promu la croissance de la plante ainsi que son rendement de près de 50 % (Yu et al. 2011). Les COV, quant à eux, sont des molécules lipophiles de faible masse moléculaire ; ils sont impliqués dans des communications sans contact entre organismes, ainsi que des activités antimicrobiennes (Kai et al. 2009). Des COV produits par *Bacillus amyloliquefaciens* ont inhibé la croissance de *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae* et *Sclerotinia sclerotiorum*, et ont eu un effet positif sur la croissance des racines d'*A. thaliana* (Asari et al. 2016) ; leur activité d'inhibition de croissance et de germination contre *F. oxysporum* a également été rapportée (Yuan et al. 2012). *Bacillus* produit également des enzymes lytiques,

dont des chitinases (Chang et al. 2003; Goma 2012; Huang et al. 2005), qui présentent des activités antifongiques contre plusieurs pathogènes tels que *F. oxysporum*, *Botrytis elliptica*, *A. flavus*, *A. niger* ou *Pythium ultimum*.

c. Produits de biocontrôle dérivés de *Bacillus*

De par sa grande diversité de modes d’actions, *Bacillus* se trouve dans de nombreuses applications sur le marché du biocontrôle en France, avec comme représentants principaux *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* avec un grand nombre de pathogènes fongiques cibles (Tableau 3).

Tableau 3 : Antifongiques commerciaux de biocontrôle dérivés de *Bacillus* autorisés en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l’Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022). Seuls les produits phytopharmaceutiques de références et de seconde gamme (produit de référence mis sur le marché dans une autre gamme) sont représentés.

Nom commercial	Substance active (souche)	Pathogènes cibles
TAEGRO	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24	Bactérioses, <i>Pleiochaeta</i> , Mildiou, <i>Oïdium</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i>
INTEGRAL PRO	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI600	Champignons autres que pythiacées, <i>Phoma</i> (<i>Leptosphaeria maculans</i>)
SERIFEL	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI600	<i>Botrytis cinerea</i> , champignons autres que pythiacées, <i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Trichoderma aggressivum</i>
AMYLO-X WG	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D747	Bactérioses, feu bactérien, <i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Monilinia</i> , <i>Oïdium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Stemphylium</i>
AMYLO-X JARDIN	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D747	<i>Oïdium</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Monilinia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Stemphylium</i> , feu bactérien, bactériose
VALCURE	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> D747	Champignons (autre que pythiacées), champignons

		(pythiacées), maladies fongiques
BALLAD	<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	<i>Alternaria</i> , <i>Oïdium</i> , <i>Sclerotinia</i>
SONATA	<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	<i>Oïdium</i>
MILDORE	<i>Bacillus subtilis</i> IAB/BS03	Mildiou, <i>Oïdium</i> , <i>Venturia inaequalis</i>
HARMONIX TURF DEFENSE	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	Anthraxnose, <i>Sclerotinia homeocarpa</i> , <i>Fusarium</i> , helminthosporioses, pyriculariose, <i>Rhizoctonia</i>
SERENADE ASO	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	Anthraxnose, bactérioses, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Spilocaea oleaginea</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Monilinia</i> , <i>Oïdium</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Stemphylium</i>
SERENADE BIOFUNGICIDE	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	<i>B. cinerea</i> , <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>
SERENADE MAX	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	Anthraxnose, bactérioses, <i>Botrytis</i> , <i>Cercospora</i> , feu bactérien, <i>Oïdium</i> , <i>Monilinia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Venturia</i> , <i>Fusicladium</i>
TEXIO	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	<i>Monilinia</i> , <i>Oïdium</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Stemphylium</i> , champignons (autres que pythiacées)
TEXIO WP	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	<i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i>

d. Co-cultures impliquant Bacillus en biocontrôle

La co-culture entre *Bacillus* et d'autres microorganismes peut être notamment utilisée dans le secteur de l'énergie. C'est le cas de la co-culture entre *Bacillus thermoamylovorans* et quatre souches anaérobies de *Clostridium* pour la production de biocarburants et de biohydrogène (Chang et al. 2008). La co-culture bactérienne de *Bacillus* a été aussi décrite comme un moyen

de biodégradation, pour par exemple la dégradation de pétrole non raffiné (Tao et al. 2017), ou de pesticides comme l'endosulfan (Awasthi et al. 2003). L'activité antimicrobienne de beaucoup de ces co-cultures confirme l'intérêt de l'utilisation de *Bacillus* dans ce genre d'application : la co-culture de *B. subtilis* avec *B. pumilus*, a engendré l'inhibition de plusieurs bactéries et champignons, dont *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *A. ochraceus* et *P. roqueforti*, alors que les monocultures de ces bactéries n'a pu inhiber que certains de ces microorganismes (*S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *A. ochraceus*) (Ouoba et al. 2007). La co-culture de *B. amyloliquefaciens* avec une souche recombinante de *Corynebacterium glutamicum* surproduisant de la proline a amélioré la production de lipopeptides par *B. amyloliquefaciens* et son activité antifongique contre *B. cinerea* (Chen et al. 2022).

Comme cela a pu être vu dans les parties précédentes, avec les différents champignons exposés, *Bacillus*, notamment *Bacillus subtilis*, est un partenaire de co-culture privilégié dans les co-cultures bactériennes et fongiques, avec des études portant sur des interactions entre *Bacillus* et *Trichoderma* notamment (Fifani et al. 2022; Karuppiah et al. 2019; Li et al. 2020), ou encore *Bacillus* et *Aspergillus* (Benoit et al. 2015; Chen et al. 2015). La co-culture de *B. amyloliquefaciens*, avec *T. asperellum*, en milieu liquide a montré une production plus importante de composés antimicrobiens, dont l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide nicotinique ou encore l'acide indole-3-acétique (Wu et al. 2018). *B. subtilis*, co-cultivé avec l'endophyte *Pestalotiopsis sp.*, a produit plusieurs nouveaux composés dont de nouveaux sesquiterpénoïdes, et a retardé la croissance du champignon ; les deux partenaires ont même présenté des profils de production différents en HPLC en co-culture par rapport aux monocultures (Liu et al. 2017).

5.2.2 Pseudomonas

a. Généralités sur Pseudomonas

Le genre *Pseudomonas* appartient à la division des protéobactéries, et à la famille des *Pseudomonadaceae* (Peix et al. 2018). Ce sont des bactéries à Gram négatif, se présentant sous la forme de bacilles non sporulants. *Pseudomonas* contient des espèces pathogènes pour les humains, comme *Pseudomonas aeruginosa*, (Wu et al. 2015) ou phytopathogènes, comme *Pseudomonas syringae* (Xin et al. 2018). Cependant, ce genre regroupe également des PGPR comme *Pseudomonas fluorescens*, ce qui le rend particulièrement attrayant à étudier dans le cadre de la protection des plantes (David et al. 2018). Comme *Bacillus*, *Pseudomonas* est une bactérie qui peut se développer dans un grand nombre d'habitats comme les sols, les milieux aquatiques, les animaux et les végétaux (Winsor, Brinkman 2014). Aussi, étant capable d'interagir avec une grande variété d'organismes et d'environnements, les mécanismes d'action

de *Pseudomonas* font l'objet de nombreuses études, notamment dans une optique de biocontrôle (Weller 2007).

b. Utilisation de *Pseudomonas* en biocontrôle

En tant que genre bactérien abritant un grand nombre d'espèces qui sont des PGPR, Les mécanismes impliqués dans le biocontrôle par *Pseudomonas* sont très similaires à ceux existant chez *Bacillus*. *Pseudomonas* produit notamment des molécules bioactives telles que des antibiotiques, des sidérophores, des COV (Santoyo et al. 2012; Saraf et al. 2014), ainsi que des lipopeptides (Raaijmakers et al. 2010).

Initialement, les lipopeptides cycliques de *Pseudomonas* ont été classés en quatre familles selon leur structure : les viscosines, les amphisinges, les tolaasines et les syringomycines (Nybroe, Sørensen 2004) ; cependant cette classification est devenue moins claire après que plusieurs autres types de lipopeptides ne rentrant pas dans les catégories structurelles décrites ont été découverts, notamment des lipopeptides linéaires comme les syringofactines de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Berti et al. 2007). Aussi les lipopeptides de *Pseudomonas* peuvent maintenant être classés en lipopeptides cycliques courts ou longs selon la chaîne de l'oligopeptide qui les compose et en lipopeptides linéaires (Götze, Stallforth 2020). Leur activité antimicrobienne repose sur des interactions entre leur structure et les membranes des cibles, créant ainsi des pores. Plusieurs lipopeptides de *Pseudomonas* ont été rapportés comme ayant des propriétés antifongiques en particulier (Geudens, Martins 2018) : la nunamycine et la nunapeptine isolées d'une souche de *Pseudomonas* sp. ont montré une activité antimicrobienne, notamment contre l'oomycète *Pythium aphanidermatum* (nunapeptine) et le basidiomycète *R. solani* (nunamycine) (Michelsen et al. 2015). La syringomycine E, produite par *Pseudomonas syringae*, a réduit l'incidence de la pourriture verte des agrumes, causée par *Penicillium digitatum* (Bull et al. 1998).

Des molécules antibiotiques produites par différentes espèces de *Pseudomonas*, ont également vu leur activité antifongique rapportée : le 2,4-diacétylphloroglucinol isolé de souches de *P. fluorescens* provenant de différents sols où des arachides sont cultivées a montré une activité contre *Sclerotium rolfsii*, un pathogène de ces plantes, allant jusqu'à 75 % d'inhibition (Asadhi et al. 2013). La pyrrolnitrine, produite par *Pseudomonas chlororaphis*, a prouvé son efficacité contre *Rhizoctonia solani* et *F. graminearum* en inhibant leur développement mycélien (Park et al. 2011). En outre, *Pseudomonas* produit également des enzymes lytiques comme les chitinases et les β -1,3-glucanases qui lui permettent de digérer la chitine des parois cellulaires de champignon ou le glucane et les utiliser comme source de carbone (Gooday 1990; Leah et

al. 1991). Une souche de *Pseudomonas* fluorescente a ainsi montré une activité antifongique contre *R. solani* via la sécrétion de chitinase et de β -1,3-glucanase, conduisant à des déformations du mycélium et une accumulation du contenu cytoplasmique (Arora et al. 2008). La production de COV possédant une activité antifongique a été rapportée chez plusieurs espèces de *Pseudomonas* ; ces composés, tels que le benzothiazole, le cyclohexanol ou le demethyl trisulfide, peuvent inhiber la croissance et la germination de plusieurs pathogènes fongiques dont *Sclerotinia sclerotiorum* (Fernando et al. 2005). *Pseudomonas* produit également des sidérophores, comme la pyoverdine ou la pyochéline (Braud et al. 2010). Une souche rhizosphérique de *P. aeruginosa* produisant un sidérophore a montré une activité antifongique contre *R. solani* en l'absence de $FeCl_3$, soit en conditions de stress, suggérant que son antagonisme dépend de la production de sidérophore (Sasirekha, Srividya 2016).

c. Produits de biocontrôle dérivés de *Pseudomonas*

En France, seules deux souches de *Pseudomonas* sont autorisées en biocontrôle, *P. chlororaphis* MA342 contre *Armillaria*, un agent du pourridié, et *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 (Tableau 4).

Tableau 4 : Antifongiques commerciaux de biocontrôle dérivés de *Pseudomonas* autorisés en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022).

Nom commercial	Substance active (souche)	Pathogène cible
ROTSTOP	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	<i>Armillaria</i>
CERALL	<i>Pseudomonas</i> sp. DSMZ 13134	Champignons autres que pythiacées

d. Co-culture impliquant *Pseudomonas*

Pseudomonas est un genre utilisé couramment en co-culture. *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* ont été co-cultivés pour la biodégradation efficace et non préférentielle de composés organiques volatiles toxiques (BTEX) (Shim et al. 2002). *P. segetis*, une PGPR isolée de la rhizosphère de *Salicornia europaea*, co-cultivée avec différents pathogènes bactériens a révélé une activité antibactérienne via du quorum quenching (dégradation de N-acylhomosérine lactones impliquées dans la détection du quorum ou quorum sensing) contre *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum* and *P. carotovorum* (Rodríguez et al. 2020). Certaines co-cultures de *Pseudomonas* sont utilisées dans l'optique de biofertilisation, comme l'association d'une souche de *Pseudomonas* sp. et de *Serratia* sp.

solubilisant le phosphate qui a significativement amélioré la germination, le poids sec et la longueur des feuilles d'*Allium cepa* L. (Blanco-Vargas et al. 2020).

Plusieurs co-cultures entre *Pseudomonas* et des champignons ont été décrites. Dans le domaine médical, *A. fumigatus* co-cultivé avec *P. aeruginosa*, a induit une production plus importante d'une métalloprotéase élastase qui pourrait être impliquée dans des mécanismes de compétition et de cytotoxicité (Smith et al. 2015). La co-culture entre *F. oxysporum* et *P. aeruginosa* a conduit à la synthèse de la molécule de détection du quorum 2-heptyl-4-hydroxy-quinolone et d'alcaloïdes antifongiques, l'acide phenazine-1-carboxylique (PCA) et le phenazine-1-carboxamide (PCN), non présents dans la culture axénique de *P. aeruginosa* (Moussa et al. 2020). Dans une approche plus originale, la co-culture entre des microorganismes issus de graines de gazon et un de ses pathogènes fongiques *Clareeridia paspali* a permis d'isoler une souche de *Pseudomonas alcaligenes* qui a également inhibé la croissance de *Magnaporthe oryzae* (Wang et al. 2022).

5.2.3 Streptomyces

a. Généralités sur Streptomyces

Le genre *Streptomyces* appartient à l'embranchement des Actinobactéries, et à la famille des *Streptomycetaceae* (Anderson, Wellington 2001). Ces bactéries sont à Gram positif, aérobies et produisent du mycélium, se faisant ainsi appeler bactéries filamenteuses. Elles produisent également des spores (Figure 12). Les *Streptomyces* sont encore une fois un genre ubiquiste, se retrouvant au sein de toutes sortes d'environnements, tels que les sols, dont les rhizosphères, les végétaux, ou les milieux marins. Ces bactéries peuvent être extrémophiles, capables de survivre dans des conditions de température, de pH, teneur en sel ou pression extrêmes (Sivalingam et al. 2019).

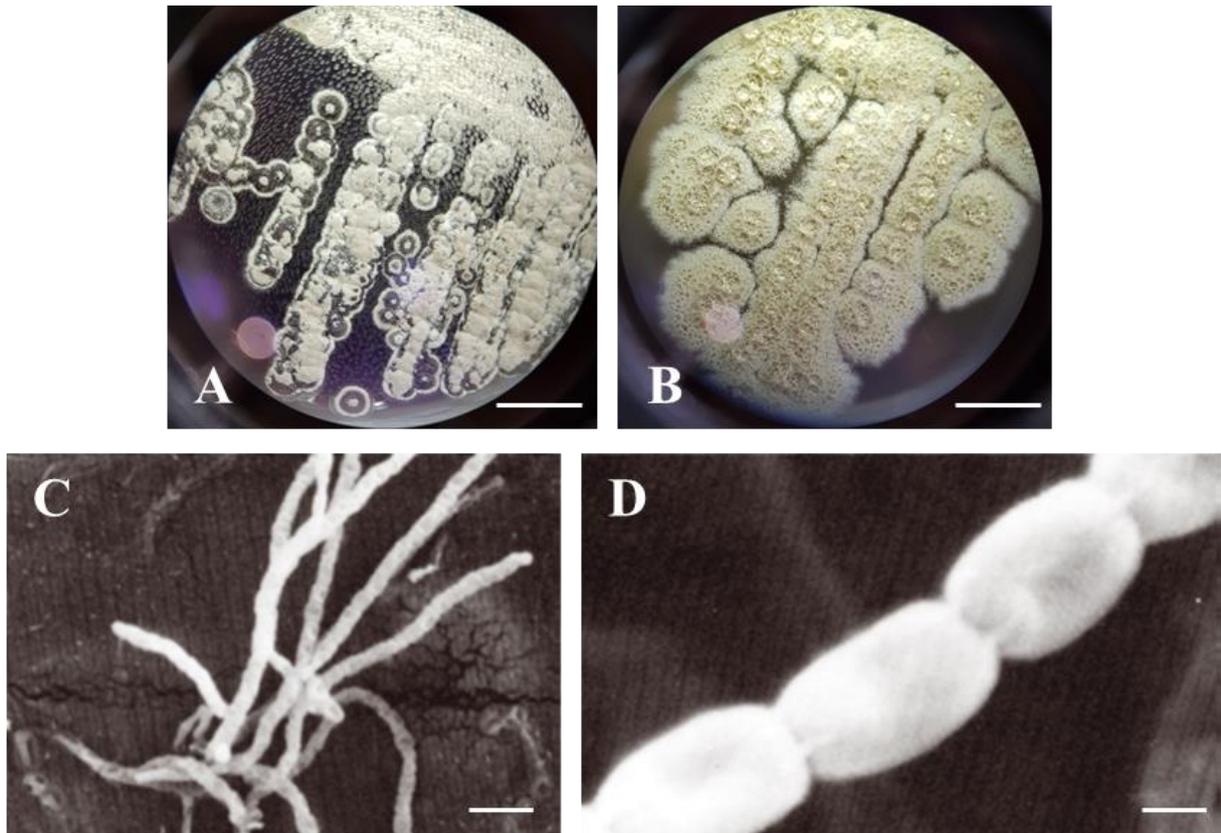


Figure 12 : **A)** Prise de vue de *Streptomyces coelicolor* M145 sur MYM, échelle 1,5 mm ; **B)** Prise de vue de *Streptomyces* sp. S0162 sur MYM, échelle 1,5 mm ; **C)** Chaîne de spores de *Streptomyces griseus* (MEB), échelle 2 μm ; **D)** Spores lisses de *Streptomyces niveus* (MEB), échelle 0,25 μm (C, D : Kämpfer 2015).

La production d'antibiotiques par *Streptomyces* découverte dans les années 1940 avec la streptothricine, en a fait une bactérie privilégiée dans l'étude de production de métabolites secondaires (Waksman 1943). Parmi les *Streptomyces* connus et employés pour leur production d'antibiotique, *S. griseus* a été le premier *Streptomyces* utilisé pour la production industrielle de la streptomycine, et *S. coelicolor* est le plus utilisé dans des études génétiques (de Lima Procópio et al. 2012). Aussi, la très grande majorité des antibiotiques découverts durant ces dernières décennies (80 %) proviennent d'actinomycètes et principalement de *Streptomyces*. Près de deux tiers des antibiotiques naturels proviennent de *Streptomyces*, comme la kanamycine, le chloramphénicol, ou encore la vancomycine. Cependant, le potentiel de production de *Streptomyces* surpasse largement ce qui est observé en laboratoire ; en estimant le nombre de composés antimicrobiens existant dans le genre *Streptomyces* à 150 000, seulement 3 % ont été identifiés (Watve et al. 2001). Comme *Bacillus* et *Pseudomonas*, les

Streptomyces sont des PGPR et des endophytes répandus, ajoutant à leur intérêt déjà existant (Viaene et al. 2016).

b. Utilisation de *Streptomyces* en biocontrôle

Streptomyces produit une très grande diversité de métabolites secondaires utilisables dans le biocontrôle, dont un large spectre d'antibiotiques, de COV, d'enzymes chitinolytiques et de sidérophores (Vurukonda et al. 2018).

Streptomyces produit des chitinases impliquées dans des activités antagonistes, et plusieurs espèces ont été étudiées pour leur production de chitinase (Blaak, Schrempf 1995; Gangwar et al. 2016; Tsujibo et al. 2000). *S. violasceusniger* a par exemple montré une activité antifongique contre *Phanerochaete chrysosporium* sur milieu solide, et l'activité antifongique était toujours présente après récupération de surnageant provenant d'une culture de *S. violasceusniger* en présence de chitine et test de ce surnageant sur le champignon. Une endochitinase s'est révélée être la source de l'activité antifongique observée (Shekhar et al. 2006). Une chitinase produite par *S. aureofaciens* a montré une activité antifongique contre *Colletotrichum musae* et *F. oxysporum* notamment, avec une inhibition de la germination des spores de *F. oxysporum* ainsi que de la croissance de ses hyphes (Taechowisan et al. 2003b). Une des chitinases produites par *S. coelicolor* a inhibé significativement la croissance mycélienne de *T. reesei*, *T. viride*, *Mucor javanicus* et *F. solani* et légèrement celle d'*A. niger*, *F. oxysporum* et *B. cinerea* (Kawase et al. 2006).

Les antibiotiques produits par *Streptomyces* sont étudiés pour leur activité antifongique (Schrey, Tarkka 2008), comme la filipine III produite par *Streptomyces miharaensis*. Cette molécule a montré une activité particulièrement importante contre *Colletotrichum gloeosporioides*, mais aussi *F. oxysporum*, *A. niger*, et *Alternaria mali* (Kim et al. 2012). Son efficacité *in planta* a également été étudiée, et elle a présenté une activité similaire au bénomyl (fongicide de synthèse appartenant à la famille des carbamates) et a pu réduire la sévérité de la maladie jusqu'à 100 %. La nystatine, produite par *Streptomyces noursei*, est un antibiotique dont l'activité antifongique est connue et dont la synthèse a également été étudiée (Brautaset et al. 2000). La nystatine est ainsi habituellement utilisée dans les tests antifongiques comme témoin ou comme inhibiteur de la croissance de champignons dans des conditions de laboratoire (Shariffah-Muzaimah et al. 2015). Les *Streptomyces* produisent également des lipopeptides possédant une activité antibiotique, comme A54145 produit par *Streptomyces fradiae* (Miao et al. 2006).

Les COV produits par *Streptomyces* ont eux aussi une activité exploitable dans le biocontrôle : les COV produits par *S. alboflavus* ont permis l'inhibition de la croissance mycélienne, la sporulation et la germination de conidies d'*A. flavus*, causant une déformation des conidies et des hyphes du champignon. Les plus actifs dans cette inhibition ont été le diméthyle trisulfide et le benzenamine. En outre, ces COV ont inhibé la production de la mycotoxine aflatoxine B₁ en régulant les gènes impliqués dans sa biosynthèse (Yang et al. 2019). Dans une autre étude, les COV de *S. alboflavus* ont inhibé la croissance de plusieurs champignons, dont *F. moniliforme*, *A. niger*, *A. ochraceus* et *P. citrinum*. Parmi ces COV, le diméthyle disulfide a inhibé jusqu'à 100 % de la croissance mycélienne et la sporulation de *F. moniliforme* (Wang et al. 2013a). Les sidérophores de *Streptomyces* ont eux aussi un potentiel de biocontrôle : la production de sidérophores par des *Streptomyces* endophytes fait partie de leur activité antifongique observée contre *A. alternata* (Verma et al. 2011). Plus récemment, l'implication de la production de sidérophores par *Streptomyces sichuanensis* dans l'inhibition de la race tropicale 4 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc TR4) a été prouvée ; *S. sichuanensis* a également montré une capacité à réduire de façon significative l'infection de Foc TR4 dans les plants de banane et les symptômes de la maladie (Qi et al. 2022).

c. Produits de biocontrôle issus de *Streptomyces*

Un seul produit de biocontrôle issu de *Streptomyces* est disponible sur le marché français, et son efficacité est rapportée contre *Fusarium* (Tableau 5).

Tableau 5 : Antifongique commercial de biocontrôle dérivé de *Streptomyces* autorisé en France (selon la Liste des produits phytopharmaceutiques du biocontrôle générée par le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire datant du 20 mai 2022).

Nom commercial	Substance active (souche)	Pathogène cible
MYCOSTOP	<i>Streptomyces</i> K61 (anciennement <i>Streptomyces griseoviridis</i>)	Champignons (pythiacées et autres) Efficace contre <i>Fusarium</i> sp.

d. Co-cultures impliquant *Streptomyces* en biocontrôle

Comme cela a été vu précédemment, le potentiel de production de *Streptomyces* n'étant pas révélé dans les conditions de recherche habituellement utilisées, la co-culture peut être un moyen de découvrir de nouveaux métabolites ou d'induire la production de métabolites par *Streptomyces* (Ibrahimi et al. 2020). La co-culture d'un *Streptomyces* issu d'un milieu marin et

de *Bacillus mycoides* a par exemple conduit à la production de dérivés de tryptamine algicides, dont des bacillamides, non détectés en monocultures (Yu et al. 2015). Plusieurs *Streptomyces* issus de sols rouges (sols acides, riches en argile et en fer et oxides d'aluminium) ont été cultivés avec différentes bactéries contenant de l'acide mycolique ; ces co-cultures ont conduit à l'induction de la synthèse de plusieurs nouveaux composés, dont des polykétides et un sidérophore. Certaines co-cultures ont également présenté une activité antimicrobienne contre *T. viride*, *M. luteus* et *E. coli* (Wang et al. 2021).

La co-culture de *Streptomyces lunalinharesii* avec *R. solani* a conduit à l'élicitation de métabolites secondaires inhibant la croissance mycélienne de *R. solani* non détectés en culture axénique, dont une possible anisomycine qui est une pyrrolidine antibiotique, et un sidérophore, la desferrioxamine E (Maimone et al. 2021). La co-culture entre *Streptomyces rochei*, un actinomycète marin, et *Rhinocladiella similis* a conduit à la production de métabolites secondaires *de novo* par *S. rochei*, dont les acides gras borrelidines J et K, qui ont montré une activité antibactérienne contre *S. aureus*. (Yu et al. 2019). Une souche de *Streptomyces* sp. isolée d'un amendement organique a montré, lors d'une co-culture avec *F. verticillioides*, une inhibition du pathogène ainsi que de la production de fumonisine, une mycotoxine, par ce dernier avec une inhibition maximale de 97,4 % dans des cultures de 5 jours (Nguyen et al. 2020). L'analyse métabolomique de l'interaction entre les deux microorganismes a montré une possible affectation de la paroi cellulaire de *F. verticillioides*, de sa synthèse protéique et de sa production d'énergie par *Streptomyces* sp. notamment.

5.2.4 Les bactéries lactiques

a. Généralités sur les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (lactic acid bacteria ou LAB) sont caractérisées par la production d'acide lactique comme produit catabolique majoritaire du glucose. Elles sont typiquement aérotolérantes, organotrophes et se présente sous la forme de coques ou de bacilles (Figure 13) (König, Fröhlich 2017). Les LAB appartiennent principalement à l'ordre des *Lactobacillales*, dans la classe des *Bacilli* tandis que *Bifidobacterium* appartient à la classe des actinobactéries. Parmi les LAB appartenant aux *Lactobacillales* existe la famille des *Lactobacillaceae* à laquelle les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus* appartiennent. Le genre *Lactobacillus* est l'un des genres les plus importants impliqués dans la microbiologie alimentaire et l'alimentation humaine, du fait de son action de conservation des aliments ainsi que ses vertus probiotiques. Les LAB sont présentes dans des environnements riches en nutriments, tels que les végétaux et fruits en décomposition, les produits laitiers, la viande fermentée et toute une diversité

d'aliments, ainsi que des muqueuses humaines et animales. Elles sont impliquées dans de nombreux processus de fermentation, pour les produits laitiers comme la fabrication de yaourt, de fromage, de kéfir (Sieuwerts et al. 2008) ou les légumes comme pour le kimchi (Chang et al. 2010).

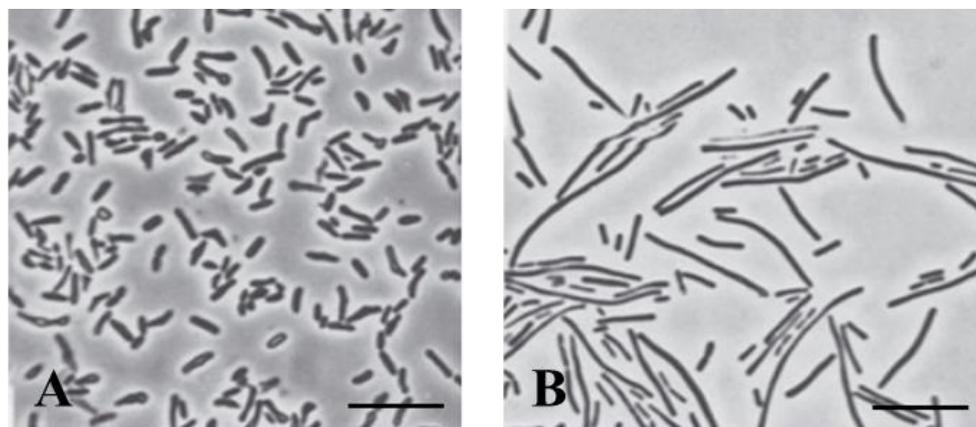


Figure 13 : Micrographes à contraste de phase montrant différentes morphologies de LAB : **A)** Cellules de *Lactobacillus minor* ; **B)** *Lactobacillus fermentum*, échelle 10 μm (Hammes, Hertel 2015).

Les LAB ont des propriétés antagonistes contre les bactéries et les champignons pathogènes et sont idéales pour le développement de BCA après la récolte de denrées alimentaires du fait de leur absence de production de composés toxiques pour les humains (Linares-Morales et al. 2018).

b. Utilisation des Lactobacillus dans le biocontrôle

La production de peptides antimicrobiens, comme la bactériocine, d'acides gras et d'acides organiques par les LAB est la principale source de leur activité antifongique et constitue un grand intérêt dans la conservation des aliments et le biocontrôle post récolte (Schnürer, Magnusson 2005). En 2003, l'isolement de plus de 1200 souches de LAB provenant de différents environnements, notamment de matériel végétal comme des feuilles, des tiges et des fleurs, a été entrepris. Parmi ces souches, 10 % ont montré une activité antifongique, et 42 ont été retenues. Ces isolats possèdent une activité en particulier contre *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *F. sporotrichioides*, *P. commune* et la levure *R. mucilaginosa* (Magnusson et al. 2003). Les composés actifs de quatre souches, appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*, ont été identifiés comme étant des dipeptides cycliques, cyclo(Phe-Pro) et cyclo(Phe-4-OH-Pro), et de l'acide phényllactique.

L'acide phényllactique (PLA) est décrit dans plusieurs autres études rapportant l'activité antifongique de LAB, notamment de *Lactobacillus*. *L. plantarum* produit par exemple du PLA en plus de dipeptides cycliques ; le PLA produit a une activité antifongique synergique avec un des deux dipeptides, le cyclo(LPhe–L-Pro) (Ström et al. 2002). Aussi le PLA a démontré sa capacité à inhiber la croissance de plusieurs champignons comme *Fusarium* sp., *A. niger*, *A. ochraceus*, dont des espèces mycotoxinogènes comme *A. flavus*, *P. verrucosum* et *P. citrinum* (Lavermicocca et al. 2003). Plusieurs souches de *Lactobacillus* ont été étudiées pour leur potentiel antifongique, et parmi elles, les plus efficaces étaient *L. acidophilus* pour lequel aucune production de PLA n'a été détectée et *L. casei*, le meilleur producteur de PLA. Les *Lactobacillus* étudiés ont été particulièrement efficaces contre *B. cinerea* (Cortés-Zavaleta et al. 2014).

Les bactériocines sont des peptides produits par les LAB qui sont couramment étudiés pour leur activité antimicrobienne, comme la nisine, utilisée pour son activité contre les bactéries à Gram positif notamment (De Vuyst, Leroy 2007). *Lactobacillus pentosus* produit un peptide similaire à la bactériocine, la pentocine, qui a montré un effet fongistatique contre *C. albicans* et a causé le développement de pseudohyphes chez la levure (Okkers et al. 1999). Un acide gras hydroxylé produit par la conversion d'acide linoléique par *Lactobacillus hammesii* a montré une activité antifongique contre *A. niger* et *P. roqueforti*, probablement via son interaction avec leur membrane (Black et al. 2013).

c. Co-culture impliquant des bactéries lactiques

Une co-culture connue dans l'utilisation historique des LAB est la co-culture entre *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* pour la fabrication des yaourts, dans une interaction positive induisant une coopération entre les microorganismes qui résulte en une acidification plus importante, un meilleur développement de *S. thermophilus*, la stimulation de la production de composés aromatiques, et l'augmentation de la stabilité du produit final entre autres, améliorant le rendement de la fermentation lactique (Herve-Jimenez et al. 2009). La production de bactériocine par des LAB s'est montrée inductible par la co-culture bactérienne (Chanos, Mygind 2016) ; la plantaricine A produite par *L. plantarum* a vu sa production induite par la co-culture de ce lactobacille avec *L. sanfranciscensis* et *Pediococcus pentosaceus* ; *L. plantarum* a montré une activité antibactérienne contre ses partenaires de culture (Di Cagno et al. 2010).

Les LAB sont souvent co-cultivées avec des levures dans le cadre de fermentations alimentaires comme la fabrication du pain au levain (Gobbetti et al. 1994). Des LAB ont été testées pour

leur activité antifongique contre des pathogènes de la fève de cacao ; pour ce faire, un criblage en plusieurs phases a été réalisé. Les LAB présentant l'activité la plus intense contre les pathogènes fongiques ont été sélectionnées pour une co-culture avec ces derniers sur des fèves de cacao. *Lactobacillus fermentum*, co-cultivé avec *A. flavus*, *Gibberella moniliformis* et *P. citrinum* a ainsi inhibé à 100 % le développement de ces pathogènes sur les fèves de cacao (Romanens et al. 2019). L'effet antagoniste de LAB a également été rapporté contre *F. graminearum* ; *L. plantarum*, confronté à ce pathogène, a inhibé sa croissance et d'autant plus par confrontation directe des cellules vivantes de *L. plantarum* avec *F. graminearum* (jusqu'à 79 % d'inhibition après 7 jours d'incubation) en comparaison avec le surnageant de culture filtré (42 %). La production de mycotoxine par le champignon (zéaralénone) a également été significativement réduite par la co-culture avec *L. plantarum* (Ben Salah-Abbès et al. 2021).

Tous ces exemples confirment l'intérêt d'une co-culture entre une bactérie et un champignon afin d'induire la production de métabolites secondaires à activité antifongique. Toutes les approches ne résultent pas des mêmes objectifs. Dans certains cas de co-culture, comme celles impliquant *Bacillus* et *Trichoderma*, les co-cultures conduisent souvent à la production de métabolites utilisés ensuite pour leur activité éventuelle contre des pathogènes ou la production d'enzymes utilisables en biotechnologie. L'autre cas de figure principal de ces co-cultures, qui est observé dans le cas des co-cultures impliquant des LAB, est une co-culture directe avec le pathogène cible, dans le but de faire directement produire des métabolites antifongiques par l'antagoniste, dans une situation créée de compétition, prédation ou de parasitisme. L'intérêt de la plupart des microorganismes présentés comme possibles candidats à des co-cultures est aussi leur rôle déjà omniprésent dans des processus de biotechnologie ou leur absence de toxicité pour les humains. Les microorganismes discutés ici ne représentent pas la totalité de ce qui existe dans les co-cultures, mais ils constituent une grande diversité de métabolites et de modes d'action possibles dans une optique de biocontrôle souhaitant éviter des molécules à action et cible unique.

6. Objectif de la thèse

L'étude bibliographique proposée dans ce chapitre a démontré l'intérêt de la réalisation de co-cultures afin de découvrir de nouvelles activités antifongiques dans le cadre de biocontrôle pour lutter contre des phytopathogènes, en particulier appartenant au genre *Fusarium*, et notamment des co-cultures impliquant des bactéries et des champignons pour la diversité d'activités qui peuvent en découler. L'objectif poursuivi est de garder cette diversité d'activités en se focalisant sur la production d'un cocktail de molécules possédant des activités antifongiques et éventuellement pouvant apporter un effet bénéfique aux plantes.

Aussi, le but de cette étude est de cribler des co-cultures champignon-bactérie, afin de déterminer si les surnageants de co-culture testés présentent une activité antifongique accrue contre un champignon filamenteux (*F. oxysporum*) et une levure (*S. cerevisiae*) par rapport aux monocultures correspondantes. Le choix des cibles des tests d'activité antifongique s'est porté sur *F. oxysporum* étant un représentant d'un taxon phytopathogène très important, comme cela a été discuté précédemment, et sur *S. cerevisiae* qui est habituellement considéré dans les tests d'activité antifongique comme champignon unicellulaire modèle.

Le choix raisonné des micro-organismes adéquats sur la base de critères sélectionnés sera examiné, ainsi que les conditions de culture appropriées choisies dans la littérature. Ensuite, dans le cadre d'un criblage primaire des activités antifongiques, des microfermentations, conduites dans un microbioréacteur, impliquant dix monocultures (cinq bactéries et cinq champignons) et vingt-cinq co-cultures mises en œuvre et les tests d'activité antifongique de diffusion sur gélose de leurs surnageants seront décrits. Enfin, la culture de champignons-bactéries sélectionnés dans des conditions de mise à l'échelle pour un criblage secondaire de l'activité antifongique des surnageants, concentrés par lyophilisation, sera étudiée. Les métabolites secondaires ainsi que les protéines et peptides présents dans les surnageants de co-culture retenus pour leur activité antifongique et les monocultures constitutives seront enfin caractérisés dans une dernière partie.

CHAPITRE 2 : SELECTION DES MICROORGANISMES

1. Introduction

L'étude bibliographique a introduit l'idée au cœur de cette thèse : la mise en place de co-cultures impliquant des partenaires bactériens et fongiques afin de découvrir de nouvelles activités antifongiques, en induisant des interactions qui ne se retrouveraient pas en monoculture. Afin d'engendrer une diversité d'activités, de modes d'action et par conséquent, de métabolites produits, l'exploration des co-cultures s'est portée sur un criblage d'association de plusieurs couples de microorganismes – bactéries et champignons.

Ce chapitre traite de la sélection raisonnée des microorganismes utilisés dans cette thèse, en partant de la mise en place des critères de décision, puis l'étude de la bibliographie jusqu'au choix des conditions de cultures adaptées au développement des microorganismes sélectionnés.

2. Critères de sélections des souches et recherche bibliographique

2.1 Critères de choix pour la mise en place de co-cultures

Les critères retenus afin de réaliser les différents objectifs de la thèse sont les suivants :

- **Une activité antifongique connue** : il est en effet préférable de travailler avec des microorganismes dont l'activité antifongique est connue au niveau de l'espèce ou du genre. L'activité reconnue vis-à-vis de des phytopathogènes appartenant au genre *Fusarium* a été également considérée ;
- La **possibilité d'identifier les molécules** potentiellement antifongiques est également à prendre en compte. En effet, l'objectif final de ce travail est d'évaluer les spécificités des co-cultures par rapport aux monocultures et d'identifier des molécules éventuellement produites de façon différentielle ;
- Les **conditions de culture** : il est important de questionner la possibilité de cultiver les souches, notamment en co-cultures. En effet, les conditions de croissance des deux partenaires doivent être compatibles ;
- L'**originalité** des souches sélectionnées : il demeure un intérêt pour des souches moins connues, constituant donc un réservoir de molécules inexplorées ou insuffisamment explorés encore.

2.2 Etude bibliographique

A partir des critères décrits dans la partie 2.1, une recherche des microorganismes pertinents pour la thèse a été réalisée.

Les recherches de microorganismes ont été réalisées grâce aux moteurs de recherche Web of Science, Scopus et Google Scholar. Les mots clés utilisés étaient liés à l'activité antifongique des microorganismes (« antifungal activity », « antifungal metabolites »), l'activité spécifique contre *Fusarium* (« Fusarium », « Fusarium head blight ») et l'éventuelle présence de co-cultures (« co-culture », « microorganism co-culture »). Les publications sélectionnées – au nombre de 54 – ont permis de constituer deux tableaux (Tableaux 6 et 7) regroupant un certain nombre de catégories : le genre et l'espèce considérés pour leur activité antifongique, la ou les cibles étudiées, la ou les molécules produites et la méthode utilisée pour leur identification, et les conditions de culture utilisées (milieu et température).

A partir d'une sélection large, l'application des critères a permis de recentrer l'étude sur quatre genres de champignons (Tableau 6) et trois genres de bactéries (Tableau 7). Le genre *Fusarium* est considéré également comme cible.

Au départ, une diversité initiale plus importante avait été explorée, avec comme critère la production de métabolites antifongiques. Cela avait mené à l'identification d'un grand nombre de candidats potentiels à la co-culture, dont une dizaine de genres bactériens et plus d'une vingtaine de genres fongiques. Les genres écartés l'ont été principalement du fait de l'incompatibilité de culture avec d'autres microorganismes : c'est le cas par exemple de *Microbispora*, une actinobactérie thermophile produisant des chitinases et des indoles à activité antimicrobienne mais étant cultivée à des températures élevées (37 à 45 °C) (Savi et al. 2015; Nawani et al. 2002).

En particulier, le genre *Lactobacillus* a été décrit dans la synthèse bibliographique car très connu pour son utilisation notamment dans la conservation après récolte des denrées alimentaires (Muhaladin et al. 2011). Leur potentiel de production de métabolites secondaires d'intérêt est bien connue. Cependant, en comparaison avec tous les autres genres qui sont aérobies, les *Lactobacillus* sont aérotolérants ou anaérobies stricts. Cette caractéristique peut rendre leur manipulation et leur culture plus complexes, notamment avec d'autres microorganismes aérobies comme les champignons filamenteux. Aussi, bien que ce genre ait fait l'objet d'une recherche pour son activité antifongique et notamment contre *Fusarium*, il n'a pas été retenu.

Tableau 6 : Les genres fongiques considérés après recherche bibliographique : genre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Pseudozyma*.

Genre	Espèce	Cibles connues	Molécule potentiellement antifongique		Conditions de culture		Référence
			Identité (ou mécanisme)	Méthode de détection	Température	Milieu	
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp.		Sidérophores, chitinases, peptaibols				(Benítez et al. 2004)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sphaerotheca fusca</i> <i>Botrytis cinerea</i>					(Elad et al. 2004)
		<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Colletotrichum capsici</i> <i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Gloesercospora sorghi</i>	Enzymes lytiques (endochitinase, exochitinase, glucanase), métabolites secondaires transporteurs	RT-qPCR	28°C (isolement)	PDA (confrontation) Milieu liquide Czapek-Dox Broth (isolement)	(Sharma et al. 2017)
		<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>			25°C	PDA PDB/CYS80 (suspension de spores)	(Vizcaino et al. 2005)
			Endochitinase			PDA Milieu SM + 0.2% (w/v) chitine colloïdale ou 5% glucose (activité chitinolytique)	(Viterbo et al. 2001)
	<i>Trichoderma gamsii</i>	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Chitinase	HPLC (inhibition de DON par <i>Trichoderma</i>)	24°C	PDA Gélose à l'avoine	(Matarese et al. 2012)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

<i>Trichoderma velutinum</i>	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Mycoparasitisme	RT-PCR (expression chitinases) HPLC (inhibitor de DON par <i>Trichoderma</i>) RT-PCR (expression chitinases)	24°C	PDA Gélose à l'avoine	(Matarese et al. 2012)
<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> Cf <i>Trichoderma harzianum</i> (Vizcaíno et al.) Sans <i>Pseudomonas vulgaris</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus niger</i>	Chitinase (42 kDa)		25°C	Milieu Czapeck-Dox PDA PDB/CYS80 (suspension de spores)	(Harighi et al. 2007) (Vizcaino et al. 2005)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Cf <i>Trichoderma harzianum</i> (Vizcaíno et al.) Sans <i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus niger</i>			25°C	PDA PDB/CYS80 (suspension de spores)	(Vizcaino et al. 2005)
<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Botrytis cinerea</i> Cf. <i>Trichoderma harzianum</i> (Vizcaíno et al.) Sans <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> + <i>Aspergillus niger</i>	Exo- α -1,3-glucanase mycoparasitisme	MALDI-TOF MS RT-PCR		Milieu minimum de Mandel + 2% glucose Milieu minimum de Mandel + une autre source de carbone (0.5% de parois cellulaires de <i>B. cinerea</i>)	(Sanz et al. 2005)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Colletotrichum fragariae</i>	Cladosporine Isocladosporine 5'-hydroxyasperentine	HPLC	24°C	PDA Milieu blé déchiqueté	(Wang et al. 2013)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Phomopsis viticola</i>	5',6-diacetyl cladosporine				
	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	<i>Phytophthora capsici</i> <i>Pythium ultimum</i>			25°C	PDA	(Paul et al. 2007)
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>		Dérivés de butyrolactone : isobutyrolactone II 4-O- demethylisobutyrolactone II	HPLC LC-MS	co-culture at 23°C	Gélose malt Milieu riz (co-culture avec <i>Bacillus</i>) Milieu levure malt + lait de riz Milieu riz (co-culture avec <i>Streptomyces</i>)	(Chen et al. 2015)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Candida albicans</i>	Flavonoïdes acides gras amides	GC-MS	25°C	YNB	(Meenambiga, Rajagopal 2018)
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Trichosporon beigelii</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Peptide (avec 6 cystéines)	RP-HPLC MALDiMS (détermination de la masse moléculaire)	30°C	YPD	(Gun Lee et al. 1999)
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	Asperazine nigerone	LCMS		GPYB (meilleure activité antifongique)	(Zulqarnain et al. 2020)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Coprinus cinereus</i>	Asperfurane				(Pfefferle et al. 1990)
<i>Pseudozyma</i>	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Acides gras (9-heptadecenoïque 6-methy-9- heptadecenoïque)	RP-HPLC/détecteur à barrette de diode (PDA)	25°C	PDA PDB	(Avis et al. 2001)
		<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida lusitaniae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Trichosporon asahii</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Flocculosine (glycolipide)				(Mimee et al. 2005)
		<i>Podosphaera xanthii</i> <i>Botrytis cinerea</i>			20/22°	YNB	(Hammami et al. 2011)

Tableau 7 : Les genres bactériens considérés après recherche bibliographique : genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, et *Streptomyces*.

Genre	Espèce Nom genre/espèce	Cible	Molécule		Conditions de culture		Référence
			Identité (ou mécanisme)	Analytique	Température	Milieu	
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Pythium</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Peptides (iturine A, Tas A, flagelline)	RP-HPLC/MS (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionnement, Sephadex G-75, chromatographie d'échange d'anions, SDS-PAGE MALDI-TOF	37°C (Température optimale)	Milieu LB	(Zhao et al. 2013)
		<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Aspergillus niger</i>	Sidérophores	chromatographie sur couche mince	30°C	Milieu gélosé CAS Chrome Azurol S (isolement) milieu acide succinique (production de sidérophores)	(Bharucha et al. 2013)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Lipopeptides (iturine A)	HPLC	37°C	gélose tryptone soja no. 3S/PDB	(Murata et al. 2013)
		Cf <i>Bacillus sp.</i> Zhao et al. (2013)	Lipopeptides (iturine A, Tas A, flagelline)	RP-HPLC/MS (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionnement, Sephadex G-75, chromatographie d'échange d'anions, SDS-PAGE MALDI-TOF	37°C (Température optimale)	Milieu LB	(Zhao et al. 2013)
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense	COV (benzènes: benzothiazoles phénol et 2,3,6- triméthylphénol composé groupe alkyle cétones: 2-nonanone, 2-décanone)	SPME GC-MS	28°C	Milieu MS modifié ([wt/vol] agar, 1.5% [wt/vol] sucrose, et 0.4% [wt/vol] TSA)	(Yuan et al. 2012)
		<i>Fusarium graminearum</i>			25°C	TSBA/5 Milieu minimum salé (M9) (acide tartrique (1 g/L choline bitartrate), urée (1.26 g/L))	(Schisler et al. 2002)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

	<i>Fusarium oxysporum</i>	Lipopeptide (fengycine) Bacillomycine D	RP-HPLC MS (ionisation par électronébuliseur en mode ion positif)	30°C	Milieu GB liquide Milieu Landy (production lipopeptide)	(Xu et al. 2013)
<i>Bacillus simplex</i>	<i>Fusarium spp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Chitinase Cellulase Pectinase Xylanase (alpha-N-arabinofuranosidase) Protéase		30°C	Milieu tryptone extrait de levure Milieu LB Gélose V8 (test d'activité antifongique)	(Khan et al. 2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Lipopeptides (mycosubtiline, surfactine, fengycine)	HPLC-MS		Milieu liquide glucose peptone ((14.3 g L ⁻¹ dextrose, 7.1 g L ⁻¹ bacto peptone, et 1.4 g L ⁻¹ extrait de levure) complété par des lipopeptides (test d'activité antifongique)	(Mejri et al. 2018)
	<i>Fusarium spp.</i>	Chitinase Cellulase Pectinase Xylanase (alpha-N-arabinofuranosidase) Protease		30°C	Milieu tryptone extrait de levure Milieu LB Gélose V8 (test d'activité antifongique)	(Khan et al. 2018)
	<i>Fusarium oxysporum</i>			25°C	TSBA/5 Milieu minimum salé (M9) (acide tartrique (1 g/L choline bitartrate), urée (1.26 g/L))	(Schisler et al. 2002)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Rhizoctonia sp.</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Pythium sp.</i>	Chitinases		30°C	Gélose chitine colloïdale	(Gomaa 2012)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

		<i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Verticillium</i> sp.					
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Cf <i>Bacillus thuringiensis</i> (Gomaa)	Chitinases		30°C	Gélose chitine colloïdale	(Gomaa 2012)
	<i>Bacillus vallismortis</i>	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Cryphonectria parasitica</i> <i>Phytophthora capsici</i>	Bacillomycine D (n-C14), Bacillomycine D (iso-C15)	RP-HPLC UV + MS détection	30°C	Pomme de terre sucrose (avec ou sans agar)	(Zhao et al. 2010)
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Cylindrocladium floridanum</i> <i>Cylindrocladium scoparium</i> <i>Sarocladium oryzae</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Macrophomina phaseolina</i> <i>Pestalotia thea</i> <i>Colletotrichum falcatum</i> <i>Colletotrichum capsici</i> <i>Colletotrichum gleosporoides</i> <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. cubense</i> <i>F. oxysporum f.sp. vasinfectum</i>	Protéase Sidérophore	HPLC (métabolites produits)	27-28°C	Gélose d'isolement de <i>Pseudomonas</i> (isolement depuis la rhizosphère) Gélose King B Gélose CAS (production de sidérophores) Gélose carboxy-méthyl cellulose (production de cellulases)	(Jha et al. 2009)
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Cf <i>Pseudomonas mosselii</i> (Jha et al.)	Protéase Sidérophore	HPLC (métabolites produits)	27-28°C	Gélose d'isolement de <i>Pseudomonas</i> (isolement depuis la rhizosphère) Gélose King B Gélose CAS (production de sidérophores) Gélose carboxy-méthyl cellulose (production de cellulases)	(Jha et al. 2009)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Dianthi</i>	Pseudobactine (sidérophore)	HPLC gel filtration	27°C 24°C (pseudobactin)	KB agar succinate medium (pseudobactin) RS medium	(Duijff et al. 1993)
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Dianthi</i>	Pseudobactine (sidérophore)	HPLC gel filtration	27°C 24°C (pseudobactin)	KB agar succinate medium (pseudobactin) RS medium	(Duijff et al. 1993)
<i>Pseudomonas</i> fluorescents	<i>Colletotrichum</i> <i>falcatum</i>	Chitinases	SDS-PAGE	27°C 28°C (chitin medium)	KB medium chitin (1 %), peptone (2%) and glycerol (1 %) medium	(Viswanathan, Samiyappan 2001)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pigments fluorescents Antibiotiques HCN Sidérophores	UV Spectrum analysis (purified antifungal compounds)	28°C	nutrient broth potato dextrose broth basal medium + 0,15% colloidal chitin from crab shell (chitinase) King's B medium with 4.4 g glycine I-1 (cyanide) CAS agar (siderophore) PDA and nutrient agar (antibiotics) PDA (fluorescent pigments)	(Pal et al. 2000)
<i>Pseudomonas</i> <i>chlororaphis</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	phenazine-1- carboxamide phenazine-1- carboxylic acid sidérophore (pyoverdine) pyrrolnitrine	HPLC, spectre UV	28°C	Milieu pomme de terre Milieu LC : Modification du milieu LB Milieu King B Milieu minéral : modification du milieu standard SSM	(Shtark et al. 2003)
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Phytophthora spp.</i>	antibiotiques	HPTLC	28°C	Milieu King B	(Koche et al. 2012)
<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i>	<i>Candida albicans</i>	pseudomycines (A-D)	RPLC			(Harrison et al. 1991)
	<i>Candida albicans</i>	lipodepsinonapeptides			Milieu RPMI avec L- glutamate sans bicarbonate de sodium	(Sorensen et al. 1996)
	<i>Candida kefir</i>	(syringomycine E, syringotoxine B, syringostatine A)				
	<i>Candida krusei</i>					
	<i>Candida lusitaniae</i>					
	<i>Candida parapsilosis</i>					
<i>Candida rugosa</i>						
<i>Candida tropicalis</i>						

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Mucor</i> spp. <i>Microsporium</i> spp. <i>Trichophyton</i> spp.						
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida kefir</i> <i>Candida parapsilopsis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Eomycines	HPLC MS RMN	23°C 27°C	Milieu King B (isolement) Milieu PD	(Miller et al. 1998)
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces sp.</i>			28°C 37°C	gélose tryptone soja YPDA gélose extrait de malt inoculation d'un milieu blé gélosé (après un milieu tryptone soja liquide)	(Palazzini et al. 2007)
	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Microsporium gypseum</i>	Chitinase dérivés cycle pyrrole	HPLC (acides organiques) GC-MS / ¹ H-NMR (métabolites antifongiques)	30°C	gélose d'isolement d'actinomycètes, casamino gélose extrait de glucose, gélose amidon caséine et gélose eau extrait de levure (isolement) milieu minium (production d'acides organiques - phosphate) gélose amidon caséine (activité antifongique)	(Jog et al. 2014)
	<i>Colletotrichum musae</i> <i>Fusarium oxysporum</i>			30°C	gélose acide humique - vitamine (isolement de tissus végétaux) Milieu ISP-2 medium (activité antifongique)	(Taechowisan et al. 2003a)
	<i>Alternaria brassicicola</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Sidérophores (catéchols, hydroxamate)		28°C	gélose acide humique - vitamine, gélose à l'avoine, gélose amidon	(Khamna et al. 2009)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Penicillium digitatum</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>				caséine (isolement) Milieu ISP-2 (purification) gélose extrait de levure et de malt (activité antifongique) Milieu substrats CAS avec Gaus No.1 modifié (sidérophores)	
<i>Streptomyces alboflavus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium citrinum</i>	COV (2-méthylisobornéol)	HS-SPME (récupération des COV) GC-MS (analyse des COV)	28°C	Milieu/Gélose synthétique Gause	(Wang et al. 2013b)
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	<i>Stagonospora nodorum</i>	Malayamicine				(Li et al. 2008)
<i>Streptomyces lydicus</i>	<i>Pythium ultimum</i> <i>Aphanomyces euteiches</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Phymatotrichum omnivorum</i>			30°C	Gélose de sporulation Milieu liquide extrait de levure casaminoacides (croissance mycélienne)	(Yuan, Crawford 1995)
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Chitinases		28°C	Milieu YMA	(Anitha, Rabeeth 2010)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>	Chitinases β -1,3-glucanase métabolites secondaires thermostables		28°C	gélose amidon caséine (isolement) Milieu ISP-2 (purification) Milieu ISP-3 (sporulation)	(Prapagdee et al 2008)
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>		Chitinases		30°C (extraction d'ARN)	milieu complet milieu minimum + chitine de carapace de crabe colloïdale ou en grain ou du glucose jusqu'à une concentration finale de 1 %	(Blaak, Schrempf 1995)
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	<i>Colletotrichum musae</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Chitinase	SDS-PAGE (pureté de l'enzyme)	30°C	milieu basal avec de la chitine colloïdale	(Taechowisan et al. 2003b)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

	<i>Bipolaris</i> sp. <i>Drechslera</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Sclerotium</i> sp. <i>Candida albicans</i>					
<i>Streptomyces coelicolor</i>		Chitinases				(Kawase et al. 2006)
<i>Streptomyces pilosus</i>		Sidérophore (ferrichrome, ferrichryline, acide rhodotulique)				(Müller et al. 1984)
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> <i>Alstonia solanacearum</i> <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	antibiotiques : ambobactine (depsipetide cyclique télomycine-like)				(Wei et al. 2015)
<i>Streptomyces hydrogenans</i> ou <i>Streptomyces violascens</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Alternaria mali</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria brassicicola</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Exserohilum</i> sp. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> <i>Fusarium moniliformae</i> <i>Cercospora</i> sp.	Bioautographie	28°C peut croître de 20 à 35 °C	Milieu SCNA (gélose amidon caséine nitrate) Milieu ISP (caractérisation de la souche) Milieu liquide SCN (milieu graine et production)		(Kaur, Manhas 2014) (<i>S. hydrogenans</i>)
	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria citri</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Botryodiplodia theobromae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Métabolites extracellulaires (de type polyène)	chromatographie sur couche mince bioautographie	30°C	gélose <i>Streptomyces</i> gélose M93 Milieu ISP (caractéristiques de culture)	(Choudhary et al 2015) (<i>S. violascens</i>)

Chapitre 2 : Sélection des microorganismes

<i>Geotrichum candidum</i>					
<i>Lasodiplodia</i>					
<i>theobromae</i>					
<i>Phoma</i> sp.					
<i>Penicillium</i> sp.					
<i>Phomopsis</i> sp.					
<i>Phomopsis mangiferae</i>					
<i>Rhizopus stolonifer</i>					
	Chitinase (65 kDa)	HPLC SDS-PAGE	30°C 28°C (production)	Milieu YMG (maintenance) Milieu CCA (criblage) Milieu X (production)	(Gangwar et al. 2016) (<i>S. violascens</i>)

Comme cela est observé sur le tableau 6, un certain nombre de champignons correspondent aux critères désirés. Il est important de noter que seuls les microorganismes de classe 1 (non pathogènes pour l'Homme) sont retenus dans les tableaux. Néanmoins, certains champignons de classe 2, tel qu'*Aspergillus fumigatus*, ont également été considérés du fait de leur activité antifongique (Li et al. 2012).

Un genre en particulier ressort parmi les champignons : *Trichoderma*, qui a été décrit dans la synthèse bibliographique pour son efficacité en tant qu'agent de biocontrôle. *Aspergillus* est également à retenir. Les genres bactériens *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* tableau 7, eux aussi connus comme étant des BCA ou des producteurs de molécules à activité d'intérêt, apparaissent comme de très bons candidats dans le cadre de cette étude. Certaines espèces n'apparaissent pas sur le tableau, comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Bacillus cereus*, toutes deux très étudiées pour leurs activités antimicrobiennes (Kumar et al. 2005; Chang et al. 2003), mais appartenant à des classes de microorganismes pathogènes.

Des recherches préliminaires ont mis en avant la présence de genres d'intérêt chez les actinomycètes (embranchement *Actinobacteria*) non *Streptomyces*. Bien que dans la recherche d'activité antimicrobienne, le genre *Streptomyces* soit très représenté, du fait de son abondance dans la nature et de son fort potentiel de production, il existe également des études basées sur les autres genres appartenant aux actinomycètes. La diversité des genres est particulièrement importante, mais il est possible de citer certains actinomycètes produisant des chitinases (El-Tarabily 2003), des sidérophores (Fang et al. 2021) ou encore des antibiotiques (Tanvir et al. 2016).

Les genres choisis à l'issue de cette recherche bibliographique sont donc au nombre de sept : quatre champignons (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Pseudozyma*) et trois bactéries (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*). En outre, un intérêt spécifique pour les co-cultures impliquant un pathogène et les interactions pouvant en découler, notamment antagonistes, a conduit à l'ajout du genre *Fusarium* dans les co-cultures considérées. De même, comme il a été avancé précédemment, les actinomycètes, dont les Streptomycètes font partie, sont producteurs de métabolites d'intérêt pour le biocontrôle de maladies fongiques. De ce fait, un neuvième genre a été ajouté sous la forme de la considération des actinomycètes non *Streptomyces* ; une souche environnementale appartenant au genre *Dietzia* a été retenue dans ce but.

3. Sélection des souches, des milieux de cultures et premières mises en œuvre.

3.1 Sélection des souches

Ainsi, le choix final des microorganismes destinés à la co-culture s'est porté sur dix espèces à la fois bien connues pour leurs activités antifongiques (les bactéries *Bacillus subtilis* et *Streptomyces coelicolor* et le champignon *Trichoderma harzianum*), ou appartenant à des genres étudiés de manière approfondie pour les métabolites secondaires d'intérêt (les bactéries *Pseudomonas syringae*, *Streptomyces* sp, *Dietzia* sp. et les champignons *Aspergillus oryzae*, *Pseudozyma aphidis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*).

Certaines des souches choisies sont issues de campagnes d'isolement de microorganismes menées au laboratoire : *Streptomyces* sp. S0162, *Dietzia* sp. DM01, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BR7 (Tableau 8). Celles-ci présentent un intérêt tout particulier notamment du point de vue de la diversité apportée dans cette étude, et par conséquent de l'originalité. Ces souches ont été ajoutées à la sélection car les campagnes d'isolement environnemental donnent souvent des résultats très intéressants en matière d'activité antimicrobienne (Khamna, et al. 2009). En effet, ces campagnes permettent la découverte de nouvelles activités ou de molécules intéressantes et en particulier selon les origines de l'isolement. Il s'agit souvent de microorganismes isolés à partir de plantes. Par exemple, il a été montré dans une étude que 191 souches de microorganismes ont été isolées du riz (*Oryza sativa* L.) et ont été identifiées comme 96 streptomycètes et 95 actinomycètes non streptomycètes. 68,6 % des bactéries isolées ont montré une faculté d'inhibition d'au moins un champignon testé parmi *F. oxysporum*, *R. solani* et *Helminthosporium oryzae* (Mingma, Duangmal 2018). Dans une autre étude, des champignons endophytes ont été isolés d'*Aralia elata* et d'*Aralia continentalis*, et 42,9 % des champignons testés pour leur activité antifongique ont montré une activité contre au moins un des six champignons testés parmi *Alternaria panax*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici* et *P. ultimum* (Paul et al. 2007).

Compte tenu de l'ensemble de ces critères, les souches retenues pour la thèse sont décrites dans le tableau ci-après.

Tableau 8 : Origine des souches utilisées dans la thèse.

Souches	Origine	Références	Utilisation
Souches bactériennes			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	American Type Culture Collection	https://genomes.atcc.org/genomes/b9410be67b4244eb?	Co-culture
<i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604	Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	GenBank: DQ318866.1	Co-culture
<i>Dietzia</i> sp. DM01	Souche environnementale isolée d'eaux usées	/	Co-culture
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145		GCA_000203835.1	Co-culture
<i>Streptomyces</i> sp. S0162	Souche environnementale isolée de bois en décomposition	/	Co-culture
Souches fongiques			
<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247	Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1247	Co-culture
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai MUCL 29707	Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain	(Gallou, Cranenbrouck, Declerck 2009)	Co-culture
<i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72	Centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur, Collection des Champignons de l'Institut Pasteur	(Jimenez-Quero et al. 2016)	Co-culture
<i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6		/	Co-culture
<i>Fusarium oxysporum</i> BR7	Souche environnementale isolée de bois en décomposition	/	Co-culture/ cible
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 1333	Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH	https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1333	Cible

Une des souches répertoriées dans le tableau 8 n'a pas fait l'objet de la sélection détaillée dans cette partie ; il s'agit de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 1333. L'espèce *S. cerevisiae* a été choisie uniquement comme cible, et non pas comme partenaire de co-culture, car c'est un organisme modèle souvent étudié dans des tests d'activité antifongique (Rao et al. 2010).

3.2 Milieu de culture pour des co-cultures

A partir des recherches bibliographiques portant sur les microorganismes à sélectionner, un critère spécifique est ressorti et a fait l'objet d'un second processus de sélection. Il s'agit des milieux de culture. En effet, lors de la recherche de métabolites secondaires, il est parfois nécessaire de faire varier la composition du milieu de culture (Frisvad 2012), et cela est encore plus vrai si l'on considère la mise en œuvre de co-cultures. Les conditions de culture (milieu de

culture inclus) faisaient partie des critères de choix des microorganismes, cependant le milieu de culture en lui-même n'a pas été considéré dans le détail. Il est pourtant un point crucial dans la mise en place de co-cultures en milieu liquide : les partenaires doivent pouvoir être cultivés ensemble, et leur développement doit donc pouvoir avoir lieu dans un même milieu. Après le choix des microorganismes, il a donc été nécessaire de sélectionner des milieux viables pour la réalisation de co-cultures.

Trois types de milieu ont été évalués : un milieu « standard », utilisé habituellement pour la culture et la propagation de chaque microorganisme considéré ; un milieu riche, dont la composition permet la croissance des microorganismes sans carence et un milieu minimum, qui comporte les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance des microorganismes.

Les milieux standards ont été choisis en fonction de ce qui était le plus utilisé dans la littérature (Tableaux 6 et 7) : LB (10 g/L Tryptone, 5 g/L Extrait de levure, 5 g/L NaCl) pour *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Dietzia maris* ; King's Broth KB (20 g/L Protéose peptone, 1,5 g/L Hydrogénophosphate dipotassique, 1,5 g/L Sulfate de magnésium heptahydraté) pour *Pseudomonas syringae* DSM 10604 ; GYM – Glucose Yeast extract Malt extract medium (4 g/L Glucose, 4 g/L Extrait de levure, 10 g/L Extrait de malt) pour *Streptomyces coelicolor* M145 ; MYM – Maltose Yeast extract Malt extract medium (4 g/L Maltose, 4 g/L Extrait de levure, 10 g/L Extrait de malt) pour *Streptomyces* sp. S0162 ; PDB – Potato Dextrose Broth (4 g/L Extrait de pomme de terre, 20 g/L Dextrose) pour *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Cladosporium cladosporioides* PNF6, *Fusarium oxysporum* BR7.

Les milieux riches ont été utilisés pour la co-culture (Nutrient Broth NB : 10 g/L Peptone ; 10 g/L Extrait de bœuf, 5 g/L NaCl, et LB). Un milieu minimum modifié a également été utilisé pour la co-culture : le GMM ou Glucose minimum medium (Barratt et al 1965) modifié avec la moitié de NaNO₃ dans le milieu remplacé par du NH₄Cl (Tableau 9). Pour les milieux solides, les compositions étaient les mêmes que celles des milieux liquides, avec un ajout de 15 g/L d'agar.

Tableau 9 : Composition détaillée du milieu GMM (glucose minimum medium) utilisée dans cette étude.

Solution de sels x20	
NaNO ₃	60 g/L
NH ₄ Cl	60 g/L
KCl	10,4 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	10,4 g/L
KH ₂ PO ₄	30,4 g/L
Solution d'oligo-éléments x 500 dans 100 mL d'eau distillée	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 g
H ₃ BO ₃	1,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,16 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,11 g
EDTA	5 g
Milieu GMM pour 100 mL	
Solution de sels x20	5 mL
Solution d'oligo-éléments x500	0,2 mL
Solution de glucose 10 %	10 mL
Eau distillée	85 mL

Les spores des microorganismes sporulants ont été récoltées après culture pendant 4 à 7 jours de ces microorganismes sur un milieu solide (PDA pour les champignons ou MYM pour *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces coelicolor* M145). Les boîtes de Petri ont été remplies avec 5 mL d'une solution stérile d'eau physiologique (0,9 % NaCl) et quelques gouttes de Tween 80, afin de complètement recouvrir le microorganisme. Ensuite, un étaleur stérile a été utilisé pour frotter la surface de la boîte, et la solution de spores obtenue a été filtrée à travers du Mira cloth stérile (Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Allemagne). La solution de spores a ensuite été diluée dans 50 % v/v de Glycérol, et les spores ont été comptées avec une cellule de Thoma, puis conservées à -80 °C.

Les milieux standards ont été identifiés et choisis à partir des tableaux 6 et 7. Les milieux riche et minimum ont également été choisis dans la littérature, comme milieux ayant été utilisés en co-culture entre bactéries et champignons (Karuppiyah et al. 2019; Fifani et al. 2022). L'intérêt de l'utilisation de milieux riche et minimum est aussi de jouer sur la production des métabolites secondaires, avec soit la fourniture d'un milieu possédant tous les nutriments nécessaires au développement des microorganismes (VanderMolen et al. 2013) ou celle d'un milieu minimum ou limitant (Schwarz et al. 2021). Cette optique est couramment utilisée dans les méthodes OSMAC, afin d'activer des clusters de gènes biosynthétiques (BGC) et d'induire la production de métabolites secondaires cryptiques. Ici, l'objectif était donc d'intégrer une condition de milieu riche et une condition de milieu minimum afin de maximiser la possibilité d'observer de nouvelles activités. Les différents milieux sélectionnés pour chaque microorganisme ont été résumés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Milieux sélectionnés après étude de la bibliographie : milieux standards LB, KB, MYM, GMM, PDB, milieu riche NB, et milieu minimum GMM modifié. Les milieux riche et minimum sont destinés à tous les microorganismes, et les milieux standards aux microorganismes correspondants.

Souche	Milieu standard	Milieu riche	Milieu minimum
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	LB		
<i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604	KB		
<i>Dietzia</i> sp. DM01	LB		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	MYM/GMM		
<i>Streptomyces</i> sp. S0162	MYM		
<i>Pseudozyma aphidis</i> DSM 1247		NB	GMM modifié
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai MUCL 29707			
<i>Aspergillus oryzae</i> UMIP 1042.72	PDB		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> PNF6			
<i>Fusarium oxysporum</i> BRCR7			

3.3 Essais préliminaires

Afin de tester la croissance des microorganismes dans les différents milieux (standard, riche et minimum), ils ont été cultivés dans des tubes de volume de 5 mL. Les tubes contenant le milieu standard, riche ou minimum ont été soit inoculés avec une colonie de bactérie (*B. subtilis* ATCC 21332, *P. syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01) ou de champignon (*P. aphidis* DSM 1247) soit avec des spores de bactérie (*S. coelicolor* M145, *Streptomyces* sp. S0162) ou de champignon (*T. harzianum* Rifai MUCL 29707, *C. cladosporioides* PNF6, *A. oryzae* UMIP 1042.72). Ces tubes ont ensuite été incubés pendant une semaine jusqu'à une vingtaine de jour pour les champignons, à 29 °C, agitation 120 rpm dans un incubateur-agitateur Multitron (INFORS HT, Suisse), jusqu'à atteindre une phase de croissance stationnaire. La DO₆₀₀ des

échantillons a été lue avec un spectrophotomètre photoLab® 6100 VIS (WTW, Xylem Analytics GmbH, Allemagne).

Les premiers tests ont eu pour objectif de dénoter un développement des microorganismes dans des conditions sélectionnées afin de mettre en place les expériences de co-cultures dans des conditions adéquates de culture.

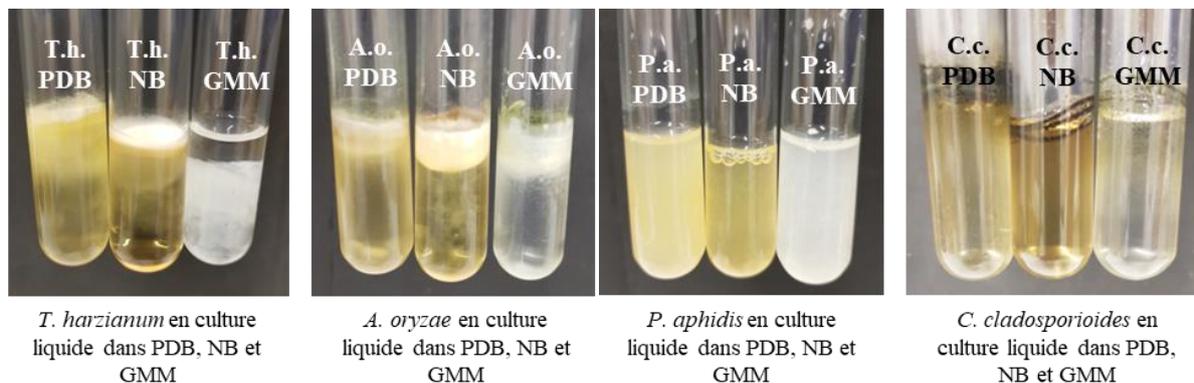


Figure 14 : Exemples de mise en culture de champignons pour les tests de croissance dans les milieux standard, riche et minimum (ici PDB, NB et GMM respectivement), pour T.h. : *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, A.o. : *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, P.a. : *Pseudozyma aphidis* DSM 1247 et C.c. : *Cladosporium cladosporioides* PNF6.

Le suivi de croissance a été possible via observations visuelles et suivi de DO₆₀₀. Pour certains microorganismes ; comme les champignons filamenteux (Figure 14), le suivi de croissance par la DO₆₀₀ n'était pas applicable, comme cela est notable avec *C. cladosporioides* PNF6, qui s'est principalement développé sur les parois du tube de culture. Cependant, ce premier suivi a permis d'avoir une indication du développement des différents microorganismes dans les milieux sélectionnés.

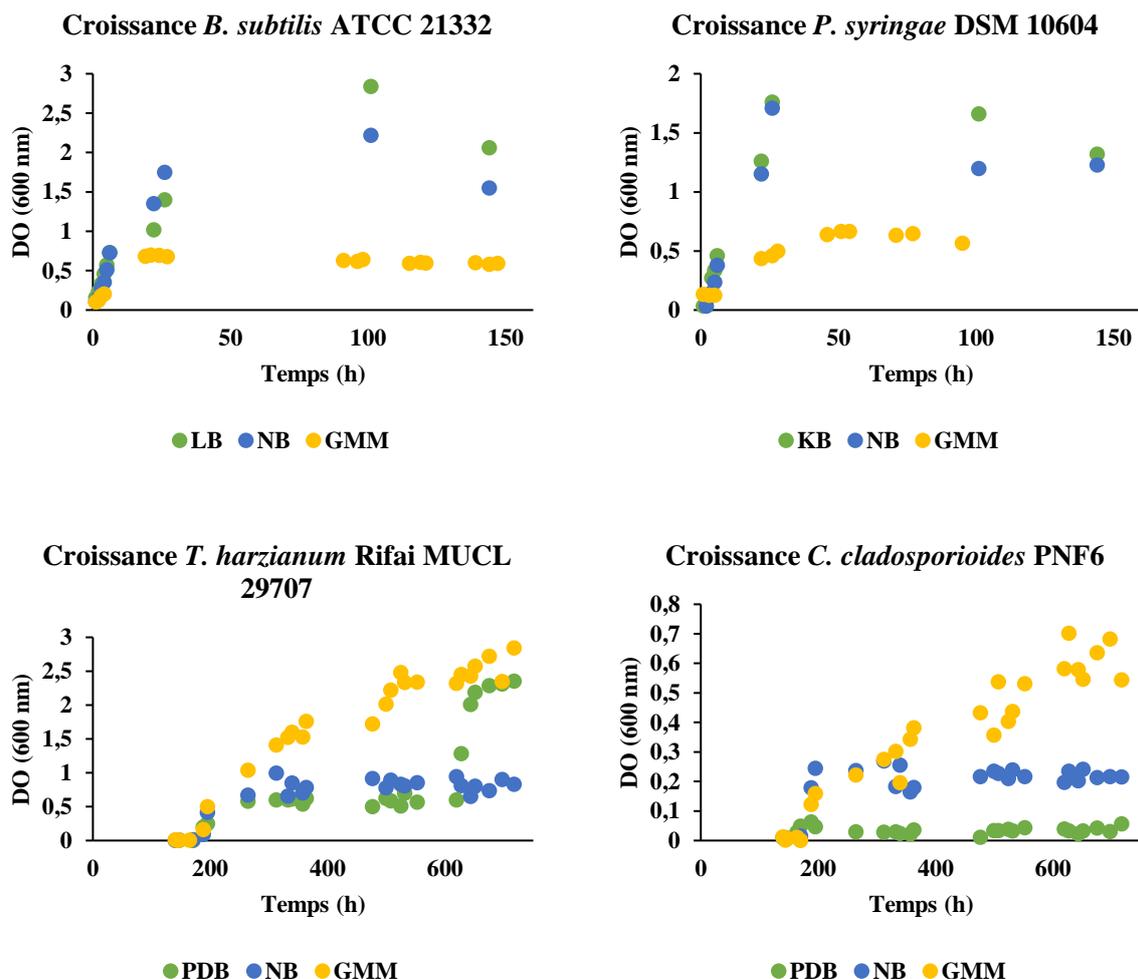


Figure 15 : Exemples de suivi de croissance par DO₆₀₀ de différents microorganismes (*Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) dans les milieux choisis standards (respectivement LB, KB et PDB), riche (NB) et minimum (GMM).

La figure 15 montre le développement de certains microorganismes dans les différents milieux choisis. Pour les bactéries *B. subtilis* ATCC 21332 et *P. syringae* DSM 10604, un bon développement est observé dans les milieux standards (LB et KB : DO₆₀₀ maximale de 2,84 et 1,76 respectivement), ainsi que dans le milieu riche NB (DO₆₀₀ maximale de 2,22 et 1,71 respectivement). Dans le milieu GMM, il y a bien développement des bactéries. Cependant, il est très minime et n'atteint pas une DO₆₀₀ de 1 même après plusieurs jours. Ce type de développement a également été observé pour *Dietzia* sp. DM01 ; les seules bactéries qui ont montré un développement satisfaisant dans le milieu GMM ont été *Streptomyces* sp. S0162 et *S. coelicolor* M145. Néanmoins, dans le cas du développement des *Streptomyces* et des champignons, bien que la croissance observée soit sous forme de mycélium et non

planctonique, il a été possible d'observer une évolution de la DO₆₀₀ en rapport avec les observations de croissance (Figure 15). Cependant, la croissance sous forme de pellets ou sur les parois du tube ne permet pas une évaluation spectrométrique précise (exemple de *C. cladosporioides* PNF6). Aussi, les champignons ont tous montré un développement dans les trois milieux.

Ces manipulations préliminaires ont en outre pu montrer que le milieu LB a permis le développement de tous les microorganismes tout comme le milieu NB, et a été retenu comme deuxième condition de milieu riche. Ces expériences ont également permis de confirmer la température choisie (29 °C) pour toutes les monocultures et co-cultures. Le milieu minimum étudié, le milieu GMM modifié, a permis une faible croissance des microorganismes non filamenteux mais une excellente croissance des microorganismes filamenteux. Il a donc été utilisé pour *Streptomyces coelicolor* M145, *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons.

Les milieux riches dans lesquels les microorganismes ont tous pu se développer ont une composition riche – extrait de levure et tryptone pour LB, et extrait de bœuf et peptone pour NB. Pour le milieu minimum, les bactéries non filamenteuses ont montré un développement réduit en comparaison avec les microorganismes filamenteux. L'ajout de la forme d'azote (NH₄Cl) utilisée dans d'autres milieux bactériens (M9) et privilégiée par les microorganismes lorsqu'elle est présente dans le milieu n'a pas permis d'améliorer leur croissance (Recous, Mary, Faurie 1990). Il est possible que l'ammonium disponible ne l'ait pas été en quantité suffisante, et que les conditions de l'assimilation du nitrate n'aient pas été optimale (comme par exemple une limitation en oxygène) (Nakano, Hulett 1997; Hernandez et al. 1991). Par exemple, la mise en place d'une co-culture entre un organisme capable d'assimiler le nitrate, comme *Trichoderma harzianum*, et un autre ne le pouvant pas, comme *Bacillus velezensis*, a été décrite dans la littérature (Fifani et al. 2022). Cependant, le milieu GMM n'a pas été retenu pour les conditions de co-culture car *B. subtilis* ATCC 21332, *P. syringae* DSM 10604 et *Dietzia* sp. DM01 s'y sont peu développées, montrant toutes une DO₆₀₀ inférieure à un même après plusieurs jours.

4. Conclusion

A l'issue de la recherche bibliographique entreprise afin de déterminer un nombre fini de microorganismes et de décider de conditions de cultures satisfaisantes pour la réalisation de co-cultures, il a été possible d'arrêter un choix sur cinq bactéries, cinq champignons et trois conditions de milieux.

Les cinq bactéries considérées sont *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, *Streptomyces coelicolor* M145 et *Streptomyces* sp. S0162. Les cinq champignons sont *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BR7. En outre, le champignon filamenteux issu de l'environnement *Fusarium oxysporum* BR7 a été choisi comme cible des tests d'activité antifongique, avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* DSM 1333.

Des essais de croissance préliminaires ont conduit au choix de deux milieux riches NB et LB dans lesquels tous les microorganismes ont présenté un développement, et un milieu minimum, GMM modifié, dans lequel seuls les microorganismes filamenteux (les *Streptomyces* et champignons) ont montré un développement satisfaisant. La température choisie pour les cultures est de 29 °C, pour laquelle tous les microorganismes ont montré une croissance satisfaisante et l'agitation sera adaptée aux différentes conditions de volume de fermentation qui seront amenées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : CRIBLAGES PRIMAIRE ET
SECONDAIRE DES MICROORGANISMES
CHOISIS POUR LEUR ACTIVITE
ANTIFONGIQUE

1. Introduction

Les souches et les conditions de culture ayant été choisies dans le chapitre précédent, la deuxième phase de la thèse, celle du criblage, a pu être mise en place.

Pour cela, une étude en deux étapes a été entreprise : un premier criblage a été mené en très petits volumes, grâce à un microbioréacteur. Les résultats obtenus à l'issue de ce criblage ont permis de travailler avec les couples de microorganismes les plus performants lors d'un second criblage en plus grands volumes. Ainsi, des tests en conditions liquides et solides ont permis d'affiner le choix des couples d'intérêt.

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles activités antifongiques nécessite des champs d'étude plus larges et cela peut être réalisé grâce au criblage. Cela permet par exemple, notamment avec des méthodes automatisées d'inoculation ou de test, d'optimiser les conditions de culture ou les productions de métabolites (Jansen et al. 2021). Le criblage de la production de métabolites implique souvent la microfermentation à l'aide de microbioréacteurs, permettant de multiples cultures parallèles dans des volumes plus petits (Wewetzer et al. 2015). Aussi, la décision de réaliser un criblage en microbioréacteur a été prise, dans une optique de pouvoir multiplier les combinaisons de microorganismes et de suivre leur développement en temps réel.

Ce criblage a pour objectif de tester des couples pour leur activité antifongique dans les conditions de culture déterminées. Les couples en question sont les associations des souches sélectionnées (cinq bactéries et cinq champignons), conduisant à vingt-cinq co-cultures testées dans un maximum de trois conditions de milieu. A l'issue de ce criblage, les couples possédant les meilleures activités antifongiques ont été criblés dans un second temps en conditions de fioles.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel bactérien et fongique

Le matériel bactérien et fongique utilisé dans ce chapitre est le même que celui décrit dans le chapitre 2 partie 3.1.

2.2 Conditions de culture

Les conditions de culture et de récupération des spores sont les mêmes décrites chapitre 2 partie 3.2. Toutes les cultures ont été en outre réalisées à l'obscurité. La quantification des microorganismes non-sporulants a été réalisée via la mesure de la DO₆₀₀ pour *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01 et *Pseudozyma aphidis* DSM 1247 (Figure 16). Des cultures de 24 h de ces quatre microorganismes, réalisées dans leurs milieux standards respectifs ont été diluées cinq fois de façon successive, au demi (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160). Les cellules ont ensuite été comptées sur une cellule de Thoma.

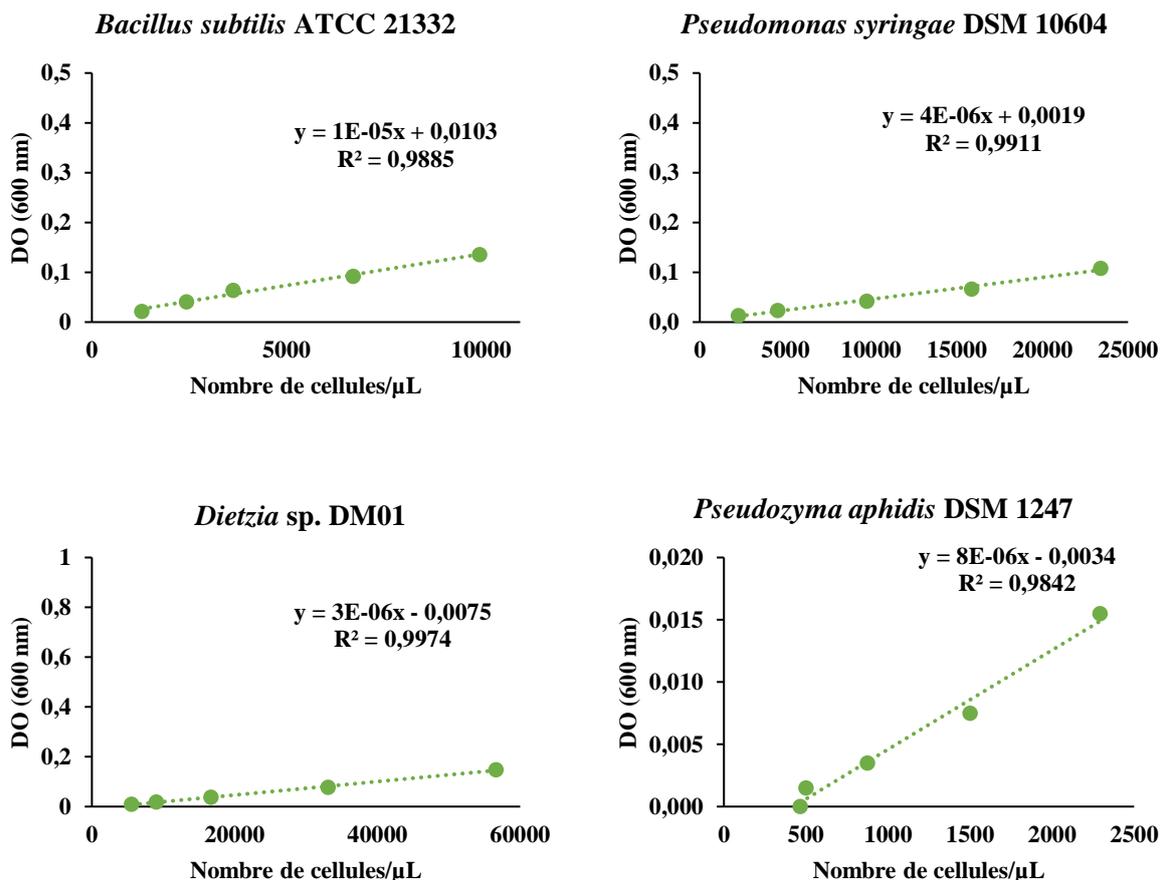


Figure 16 : Courbe d'étalonnage obtenues après mesure de DO₆₀₀ et comptage de cellules pour *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01 et *Pseudozyma aphidis* DSM 1247.

Le meilleur coefficient de détermination est retrouvé avec *Dietzia* sp. DM01 ($R^2 = 0,9974$). Ces courbes ont ensuite été utilisées pour déterminer le volume nécessaire à prélever pour inoculer 5.10^5 cellules pour une pré-culture de ces micro-organismes à une DO_{600} donnée.

2.3 Criblage primaire : Conditions de microfermentation

Les monocultures et les co-cultures bactéries-champignons ont été tout d'abord réalisées dans un microbioréacteur (BioLector, m2p-labs, GmbH, Germany) illustré figure 17. Dans les co-cultures, l'inoculation du matériel bactérien et fongique a été effectuée simultanément. L'inoculum était de 5.10^5 cellules pour les microorganismes qui ont été pré-cultivés (*B. subtilis* ATCC 21332, *P. syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01 et *P.*



Figure 17 : BioLector (m2p-labs) utilisé dans cette étude.

aphidis DSM 1247) et de 5.10^5 spores lorsque cela était pertinent (pour les champignons filamenteux et les streptomycètes) dans un volume de milieu de 1,5 mL. La croissance des micro-organismes a été suivie directement avec le micro-bioréacteur, qui permet un suivi en temps réel par diffusion de la lumière ou light scattering. Les cultures ont été incubées pendant 4 jours dans des plaques à puits ronds BioLector de 48 puits à 1000 rpm et 29 °C avec une humidité fixe de 85 %. Il a été vu dans des expériences préliminaires (Chapitre 1, partie 3.3) que cette température favorisait la croissance de tous les micro-organismes choisis. À la fin des cultures, les plaques utilisées dans le microbioréacteur ont été centrifugées à $4255 \times g$ dans des rotors à godets oscillants (S6096 Swing-Bucket Aluminum Rotor with Microplates, Allegra® X-30, Beckman Coulter, Etats-Unis) pendant 15 min. Les surnageants ont ensuite été recueillis et filtrés sur $0,45 \mu m$ (Filtre MultiScreenHTS-HV, Merck-Millipore, Allemagne). Les filtrats ont ensuite été utilisés pour les tests d'activité antifongique.

2.4 Criblage secondaire pour les activités antifongiques

Des co-cultures avec les microorganismes sélectionnés lors du criblage primaire (les souches environnementales *Streptomyces* sp. S0162, *Dietzia* sp. DM01, *Fusarium oxysporum* BRCR7, *Cladosporium cladosporioides* PNF 6, et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247) ont été réalisées dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL, avec un volume de culture 50 mL, à 29 °C et 120 rpm (Multitron INFORS HT, Suisse).

L'inoculum a été de 5.10^5 spores ou de 5.10^5 cellules comme décrit dans la partie 2.2. Les microorganismes ont été cultivés pendant 5 jours, et leur croissance a été suivie visuellement chaque jour. Dans un second temps, des co-cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions mais avec des fioles de 500 mL et 50 mL de milieu. Ces co-cultures ont été réalisées avec les souches ayant présenté les meilleures activités en co-culture, soit les souches environnementales *Streptomyces* sp. S0162, *Cladosporium cladosporioides* PNF 6 ; et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042. 72, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247), à 29 °C et 90 rpm.

À la fin de l'expérience, les cultures ont été recueillies dans des tubes Falcon de 50 mL et centrifugées à 4713 x g pendant 15 min (Centrifugeuse Allegra® X-15R, Beckman Coulter). Les culots microbiens ont été récupérés pour mesurer la masse sèche : lavés trois fois à l'eau MilliQ puis déposés dans des coupelles en aluminium préalablement tarées, ils ont été séchés à 105 °C pendant 48 h et pesés dans une balance de précision (XPE105 DeltaRange®, Mettler Toledo, Etats-Unis). Les surnageants de culture ont quant à eux été échantillonnés et filtrés sous vide à travers un filtre RC de 0,2 µm. Les surnageants filtrés ont été utilisés pour des tests antifongiques sur des plaques d'agar. Une partie des surnageants a été concentrée (jusqu'à 20 mL pour un échantillon) par lyophilisation (LABCONCO FreeZone 2.5, Etats-Unis) pendant 48 h. La poudre obtenue a ensuite été remise en suspension dans de l'eau ultrapure jusqu'au volume souhaité pour concentrer les échantillons, x 5, x 10, x 20 (jusqu'à 1 mL). Les surnageants concentrés ont été utilisés pour les tests antifongiques.

2.5 Tests d'activité antifongique

2.5.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antifongique témoin

L'amphotéricine B a été utilisée comme témoin positif pour les activités antifongiques. Une CMI a été déterminée contre *S. cerevisiae* DSM 1333 et *F. oxysporum* BRRC7 sur boîte et en milieu liquide. Sur boîte, la cible a été étalée (100 µL de *S. cerevisiae* DSM 1333 dilué à une DO_{600} de 0,2 et 5.10^5 spores de *F. oxysporum* BRRC7), et un puits creusé dans la gélose. 100 µL d'une solution d'amphotéricine B ont été ajoutés à différentes concentrations : entre 32 µg/mL et 0,06 µg/mL pour *S. cerevisiae* DSM 1333 et entre 16 µg/mL et 0,03 µg/mL pour *F. oxysporum* BRRC7, avec des dilutions deux à deux. Les boîtes sont incubées à 25 °C pendant 3 jours. L'inhibition de *S. cerevisiae* DSM 1333 sur boîte a été observée jusqu'à une concentration d'amphotéricine de 2 µg/mL, avec un léger ralentissement de croissance à 1

$\mu\text{g/mL}$. Pour *F. oxysporum* BRCR7, l'inhibition n'est visible que jusqu'à une concentration de $8 \mu\text{g/mL}$ (Tableau 11).

La CMI a également été déterminée en milieu liquide sur microplaques 96 puits, en suivant le même modèle de dilution pour les deux cibles, avec $80 \mu\text{L}$ d'amphotéricine B à la concentration choisie et $100 \mu\text{L}$ de cible diluée à une DO_{600} de 0,4. Pour *S. cerevisiae* DSM 1333, la microplaque a été incubée pendant 30 min à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et agitée à 120 rpm, avec l'amphotéricine B avant lecture sur spectrophotomètre. L'inhibition de la croissance de *S. cerevisiae* DSM 1333 par l'amphotéricine B en milieu liquide est déterminée de $32 \mu\text{L/mg}$ à $1 \mu\text{L/mg}$. Pour *F. oxysporum* BRCR7, l'incubation avec l'amphotéricine B s'est réalisée sur 24 h à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et 120 rpm. L'inhibition de croissance du champignon est observée pour les concentrations $16 \mu\text{g/mL}$ à $4 \mu\text{g/mL}$ (Tableau 11).

Tableau 11 : CMI de l'amphotéricine B déterminées pour *Saccharomyces cerevisiae* DSM 1333 et *Fusarium oxysporum* BRCR7 en milieu solide et liquide.

Cible	CMI Milieu solide ($\mu\text{g/mL}$)	CMI Milieu liquide ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. cerevisiae</i> DSM 1333	2	1
<i>F. oxysporum</i> BRCR7	8	4

2.5.2 Tests d'activité antifongique sur boîte

60 mL de PDA (1 % d'agar) ont été versés dans des plaques carrées de $12 \times 12 \text{ cm}$. Le microorganisme cible a été étalé sur la plaque, soit avec des billes de verre stériles (pour *S. cerevisiae* DSM 1333), soit avec un étaleur stérile (pour *F. oxysporum* BRCR7). La culture de *S. cerevisiae* DSM 1333 a été diluée à une DO_{600} de 0,2. $5 \cdot 10^5$ spores de *F. oxysporum* BRCR7, ont été utilisées. $100 \mu\text{L}$ des surnageants précédemment recueillis ont ensuite été ajoutés dans les puits creusés dans la plaque. Les plaques ont été incubées à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant quatre jours et observées chaque jour.

2.5.3 Tests d'activité antifongique en milieu liquide

Une partie des surnageants lyophilisés a été conservée afin de les tester contre *F. oxysporum* BRCR7 en milieu liquide. Ils ont été resuspendus dans un volume de milieu PDB stérile identique au volume initial de lyophilisat. Les fioles ainsi inoculées ont ensuite été incubées pendant 2 ou 5 jours dans un incubateur agitateur (Multitron, INFORS HT) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et 120 rpm.

Après interruption des cultures, elles ont subi le même traitement que les matières sèches microbiennes dans la partie 2.4 afin de déterminer la matière sèche de *F. oxysporum* BRCR7.

Afin de déterminer le comportement de *F. oxysporum* BRCR7 dans les milieux choisis pour les tests antifongiques, la croissance de *F. oxysporum* BRCR7 a été suivie en duplicat en milieu PDB et en milieu LB lyophilisé puis resuspendu dans un même volume de PDB pour comparaison avec les tests antifongiques réalisés en milieu liquide. Le champignon a été cultivé dans les mêmes conditions que celles des tests d'activité antifongique en milieu liquide. La croissance du champignon a été suivie pendant 7 jours, avec des prélèvements pour la détermination des matières sèches matin et soir espacées de 7 h les quatre premiers jours et une dernière mesure le 7^{ème} jour au matin.

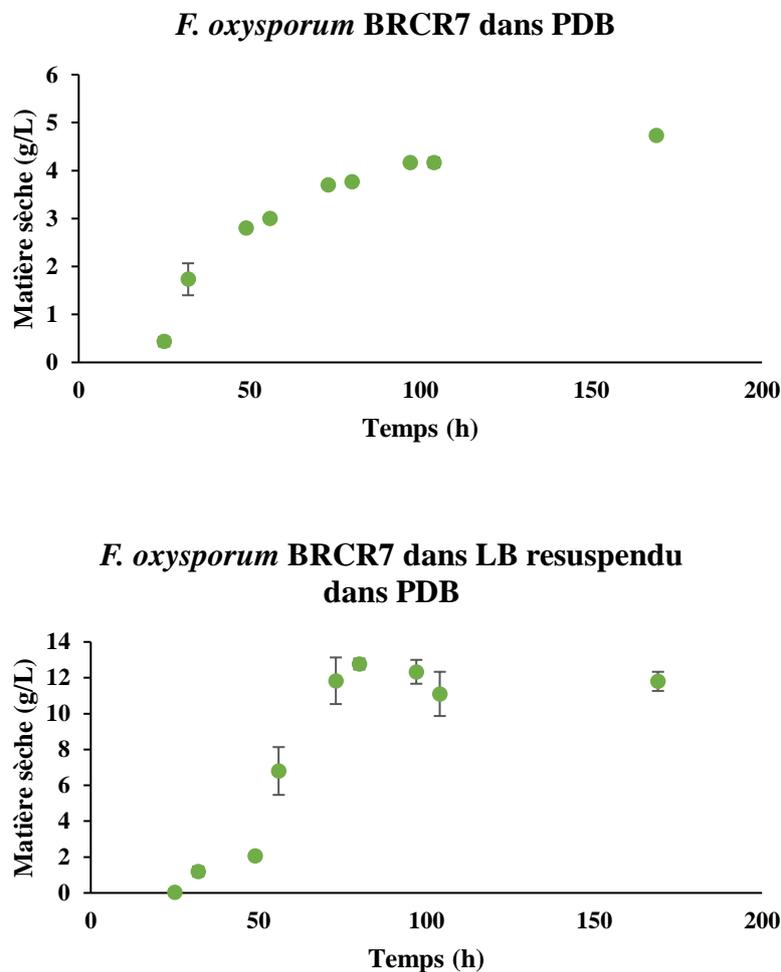


Figure 18 : Croissance de *Fusarium oxysporum* BRCR7 (matières sèches en g/L) dans le milieu PDB et le milieu LB lyophilisé resuspendu dans du PDB, pendant 7 jours.

On peut remarquer dans la figure 18 que la croissance de *F. oxysporum* BRCR7 est plus importante en milieu LB resuspendu dans PDB qu'en PDB seul. En outre, la production de pigments rose à rouge est observée en PDB. Ces pigments sont absents dans le milieu LB resuspendu dans PDB.

2.6 Cytométrie en flux

L'activité des surnageants sur la cible *S. cerevisiae* DSM 1333 a également été étudiée par cytométrie en flux, en plus des tests d'activité sur boîte.

Une préculture de *S. cerevisiae* DSM 1333 a été lancée à partir du prélèvement d'une colonie fraîche, à 30 °C pendant 48 h, dans un incubateur agitateur à 180 rpm. La préculture a été diluée jusqu'à une DO_{600} de 1, afin de préparer plusieurs échantillons : un témoin de croissance (*S. cerevisiae* DSM 1333 seul), un témoin positif avec de l'amphotéricine B à 2 µg/mL (cf. partie 2.5.1) et des échantillons de test avec les surnageants concentrés x 20 de *Streptomyces* sp. S0162 et *A. oryzae* UMIP 1042.72 ainsi que leur co-culture en milieu LB. Ces surnageants ont été ajoutés à un volume de 250 µL. 1 mL de chaque échantillon a été prélevé et dilué dix fois dans le tampon McIlvaine (tampon citrate-phosphate - 3,53 mL acide citrique et 16,47 mL Na_2HPO_4) à pH 7. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 4 min. à 10 000 rpm. Le surnageant a été éliminé, et le culot a été resuspendu dans le tampon McIlvaine. Les cellules ont été doublement marquées avec du CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) et de l'iodure de propidium (IP), afin d'évaluer l'activité estérase des cellules et l'intégrité de leur membrane, respectivement. En effet, l'IP se fixe à l'ADN après pénétration de membranes endommagées (Díaz et al. 2010), aussi des cellules dont l'intégrité membranaire est compromise montreront une fluorescence rouge liée à l'IP. Le CFDA-SE quant à lui pénètre dans des cellules viables et devient fluorescent lorsqu'il est clivé par une activité estérase.

1 mL de suspension contenant les cellules de *S. cerevisiae* DSM 1333 diluées est marqué avec 20 µL de CFDA-SE (Chemchrom V8, Biomérieux) dilué dix fois dans de l'acétone, incubé à 37 °C pendant 20 min puis marqué avec 10 µL d'une solution commerciale d'IP (Sigma-Aldrich), et incubé pendant 10 min. La suspension ainsi marquée est centrifugée pour éliminer les marqueurs dans le milieu, puis analysée avec un cytomètre en flux Sysmex CyFlow® Space (Partec, France) équipé d'un laser d'argon de 488 nm et quatre filtres : un FSC, SSC, tous deux combinés avec un collecteur de diode, un filtre passeur de bande de 536 nm (526 à 546 nm) afin de collecter la fluorescence verte de la carboxyfluorescéine (chaîne FL1) et un filtre passeur de bande de 670 nm afin de collecter la fluorescence rouge de PI (chaîne FL2) avec des tubes

photomultiplicateurs. L'acquisition des données et leur analyse sont réalisées avec le logiciel FloMax® (version 2.9, Partec, France).

En parallèle des mesures en cytomètre, des mesures de DO₆₀₀ ont été réalisées pour chaque échantillon avec un spectrophotomètre (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Etats-Unis) et les données ont été récupérées avec le logiciel Advanced Reads (Agilent Technologies).

3. Résultats

3.1 Criblage primaire des surnageants de co-cultures pour leur activité antifongique

Dix mono- et vingt-cinq co-cultures ont été mises en œuvre dans un microbioréacteur (BioLector, figure 19). Ce dispositif a permis le suivi de la croissance de tous les microorganismes par diffusion de la lumière (light scattering).

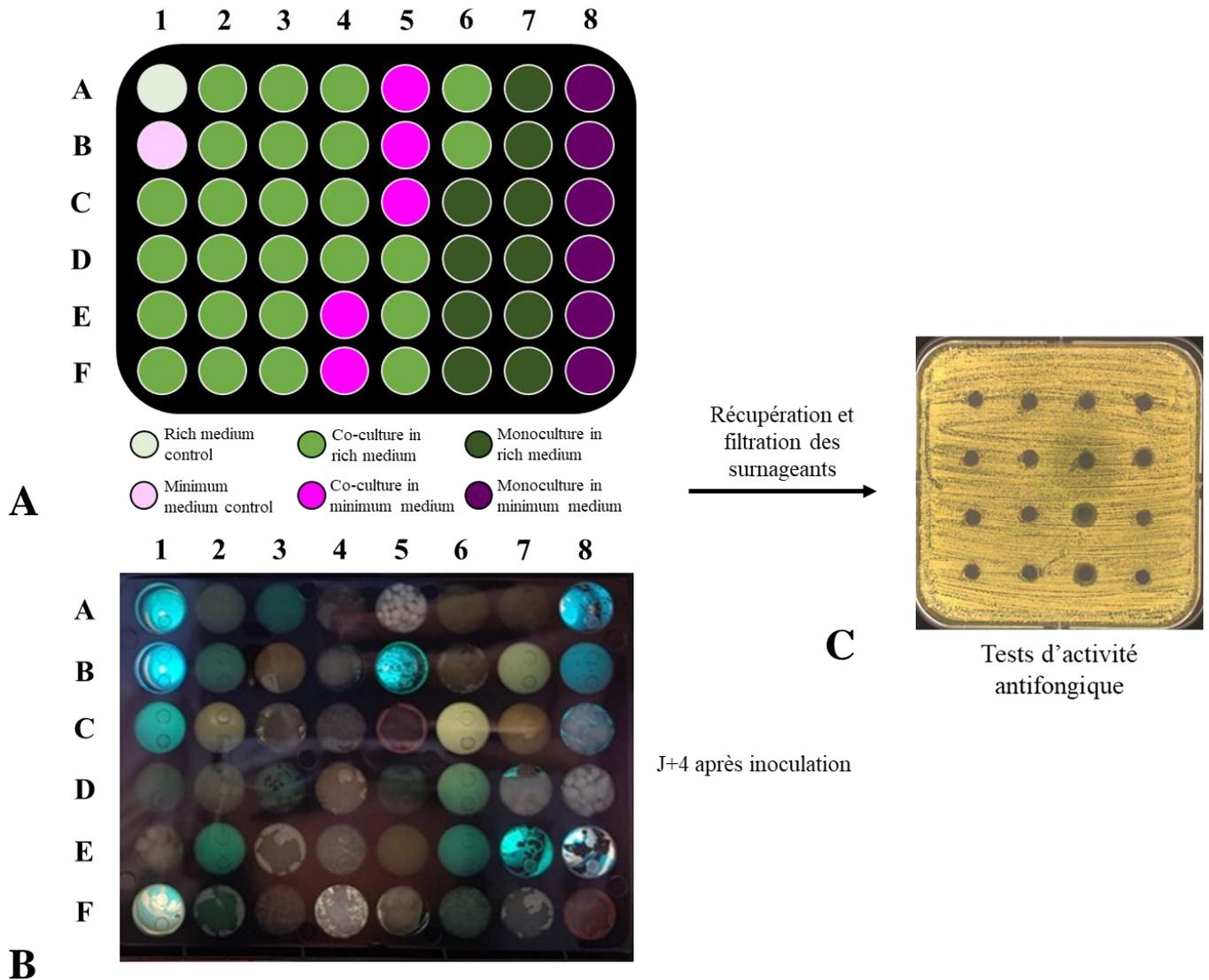


Figure 19 : Culture en BioLector et criblage primaire. **A)** Exemple d'un plan de plaque ; **B)** Photo d'une plaque après 4 jours de culture ; **C)** exemple d'un test d'activité antifongique contre *Saccharomyces cerevisiae*.

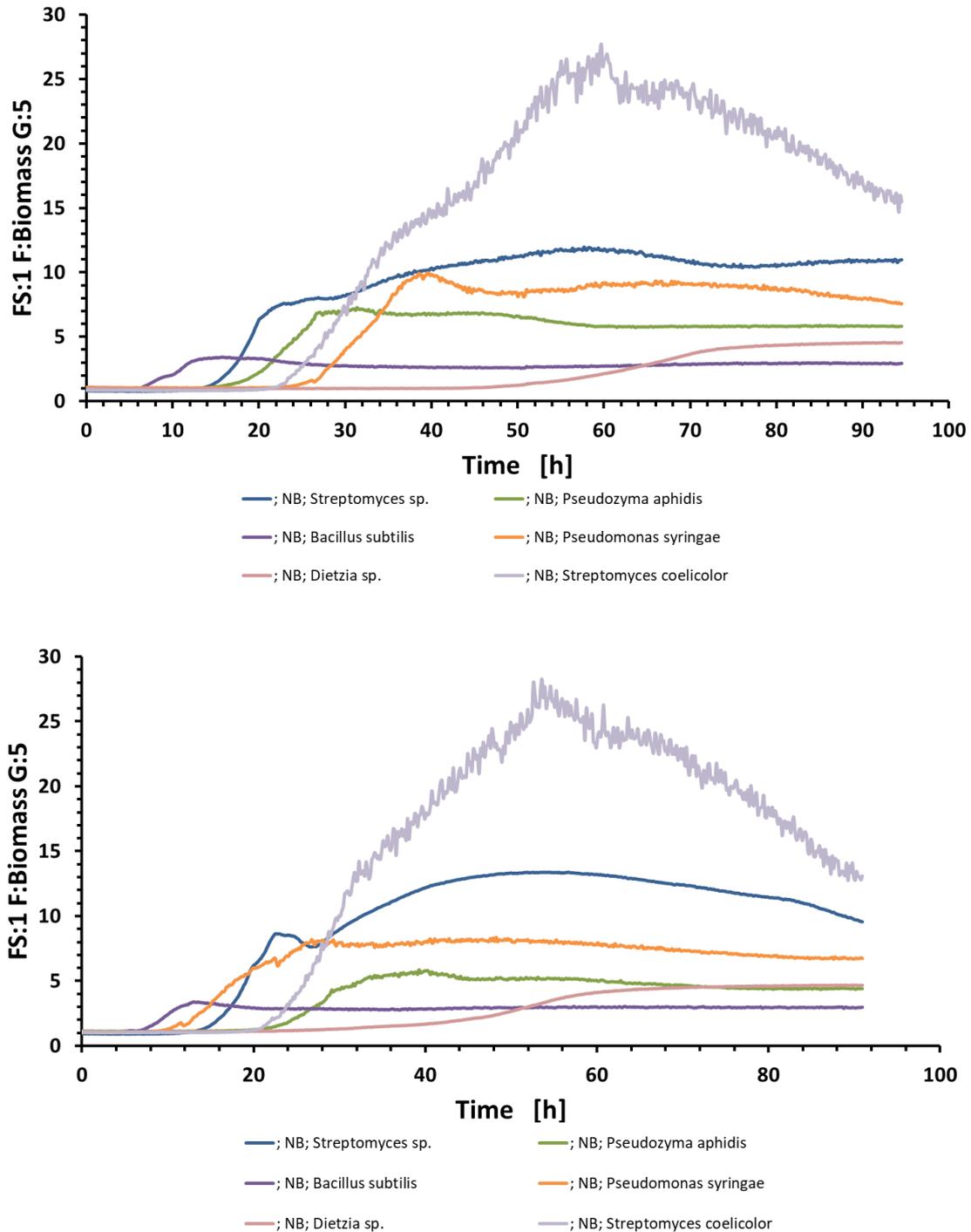


Figure 20 : Exemples de graphes de suivi de biomasse sur le BioLector : comparaisons entre des monocultures (*Streptomyces* sp. S0162, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01 et *Streptomyces coelicolor* M145) cultivées dans deux plaques différentes dans le milieu NB.

Les microfermentations se sont avérées reproductibles, avec une évolution de la biomasse qui est restée similaire entre les duplicatas des mêmes conditions (Figure 20, Annexe A). Les co-cultures ont été menées avec succès dans les milieux riches choisis, NB et LB, et dans le milieu

minimal GMM (Figure 19B). L'aspect visuel le plus évident était la production de pigments, que l'on peut remarquer sur l'image figure 19B. Une autre observation était la présence de pellets ou de croissance mycélienne indiquant le développement de champignons et le milieu montrant des signes de trouble, indiquant le développement de bactéries. Le trouble seul peut être observé par exemple dans le puits C1 de la figure 19B, pour la co-culture de *B. subtilis* + *P. aphidis*. Un exemple de trouble associé à la croissance mycélienne peut être observé dans le puits D3, pour la co-culture de *Dietzia* sp. + *C. cladosporioides*. Les monocultures peuvent être observées du puits C6 au puits F8, et montrent des exemples visibles de nébulosité (C6-E6) et de développement mycélien (C7-F7).

Dans certains cas spécifiques, comme le développement de *P. aphidis* DSM 1247 qui ressemble à une croissance planctonique (de levure) à la fois visuellement et avec l'évaluation de la biomasse (Figure 20), la distinction de sa croissance avec des bactéries qui ont également une croissance planctonique comme *B. subtilis* ATCC 21332, *P. syringae* DSM 10604 ou *Dietzia* sp. DM01 (même si *Dietzia* sp. présente une coloration rose après quelques jours de croissance) peut être difficile à effectuer, comme cela est observé dans les puits C1 (*B. subtilis* + *P. aphidis*), B2 (*P. syringae* + *P. aphidis*), ou A3 (*Dietzia* sp. + *P. aphidis*), par rapport aux puits de monoculture C6 (*B. subtilis* ATCC 21332), D6 (*P. syringae* DSM 10604), E6 (*Dietzia* sp. DM01) et B7 (*P. aphidis* DSM 1247).

Dans les milieux riches (LB et NB), vingt-deux des vingt-cinq co-cultures ont montré un développement différent de la monoculture, alors qu'il s'agissait de neuf co-cultures sur dix dans le milieu GMM (le milieu minimal). Globalement, 88,3 % des co-cultures, sur un total de soixante conditions de co-cultures, ont présenté un développement différent des monocultures correspondantes, indiquant ainsi une co-culture effective (Annexe A).

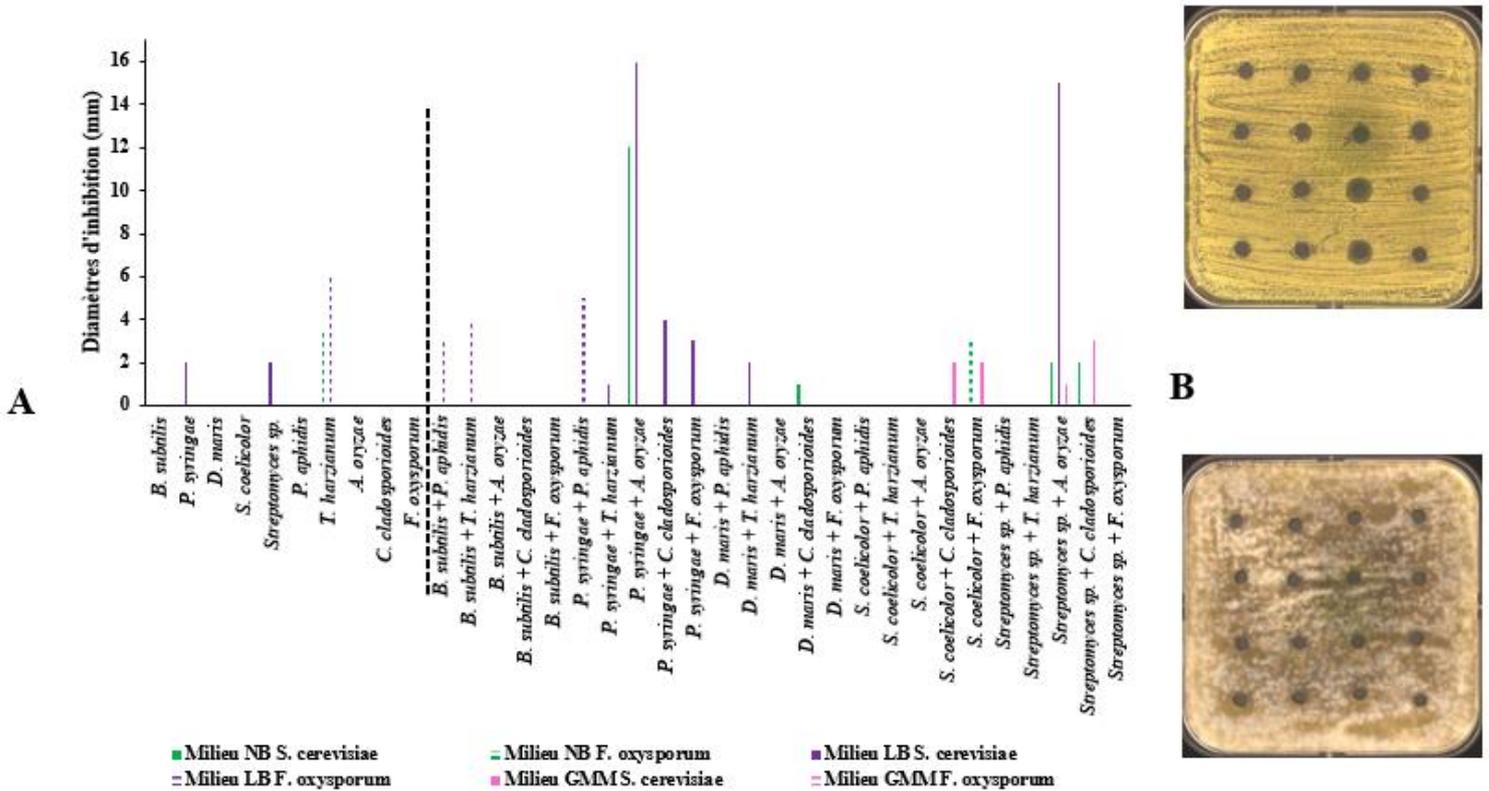


Figure 21 : A. Diamètres d'inhibition (mm) observés avec les surnageants des différentes monocultures et co-cultures cultivées dans différents milieux (NB, LB et GMM) dans un microbioréacteur, déposés dans des puits sur des plaques de gélose. B. Plaques de gélose utilisées pour cribler l'activité antifongique des surnageants contre *Saccharomyces cerevisiae* (en haut) et *Fusarium oxysporum* (en bas).

Les surnageants générés avec le microbioréacteur ont été utilisés pour réaliser des tests antifongiques contre un champignon filamenteux (*F. oxysporum*) et une levure (*S. cerevisiae*) (Figure 21). Sur les vingt-cinq co-cultures testées, treize ont montré une activité antifongique qui a été mesurée par les diamètres d'inhibition sur les plaques d'agar (Figure 21B). Sur ces treize co-cultures, quatre ont montré une activité sur différents milieux dans les conditions choisies ; contre *S. cerevisiae* : *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, et contre *F. oxysporum* et *S. cerevisiae* : *S. coelicolor* + *F. oxysporum* (Figure 21A). En particulier, un trait très intéressant est observé pour deux couples, en milieu LB et contre *S. cerevisiae* : *P. syringae* + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* présentent des diamètres d'inhibition de 16 mm et 15 mm, respectivement, alors que leurs monocultures constitutives affichent des diamètres d'inhibition de 2 mm (*P. syringae* DSM 10604), 2 mm (*Streptomyces* sp. S0162) et 0 mm (*A. oryzae* UMIP 1042.72). Dans quatre cas, l'absence d'activité d'un partenaire en monoculture est constatée : *P. aphidis* DSM 1247, *A. oryzae* UMIP 1042.72, *F. oxysporum* BRCR7 et *C. cladosporioides* PNF6.

Il est également intéressant de noter que si certaines co-cultures n'étaient pas observables par le suivi de la croissance des microorganismes, elles ont tout de même montré une augmentation de l'activité par rapport aux monocultures correspondantes : c'est par exemple le cas de *P. syringae* + *P. aphidis*, un couple dont la croissance observée ressemble à la monoculture de *P. syringae* DSM 10604 (Figure 19 et Annexe A), les monocultures correspondantes étaient toutes deux inactives contre *F. oxysporum* alors que la co-culture a montré une activité contre le champignon filamenteux (Figure 21A). Le milieu qui a révélé le plus de résultats pour l'activité antifongique était en outre le LB pour *S. cerevisiae* (huit surnageants de culture dans ce milieu montrent une activité) suivi du LB pour *F. oxysporum* et du NB pour *S. cerevisiae* (quatre surnageants de culture dans chacun de ces milieux montrent une activité). A l'issue de ce premier criblage, il a été décidé de continuer à travailler avec les milieux riches NB et LB, qui globalement ont permis une croissance de tous les micro-organismes et ont montré une meilleure activité antifongique que le milieu minimum GMM dans les conditions choisies (quatre surnageants de culture générés dans ce milieu ont montré une activité contre *S. cerevisiae*, et aucun contre *F. oxysporum*). En outre, seuls dix couples ont été retenus pour la suite de l'expérience : ceux-ci ont été sélectionnés à partir de plusieurs critères :

- Co-cultures présentant une meilleure activité qu'en monoculture ;
- Originalité : un ou deux partenaires peu ou pas utilisés en co-culture / en biocontrôle (par rapport à *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Streptomyces*) ou issus de l'environnement ;
- Effet antifongique contre *F. oxysporum*.

Ces critères de sélection ont permis d'attribuer un score (croissant selon le nombre de critères remplis par un couple) à chaque couple, conduisant à la sélection des couples suivants :

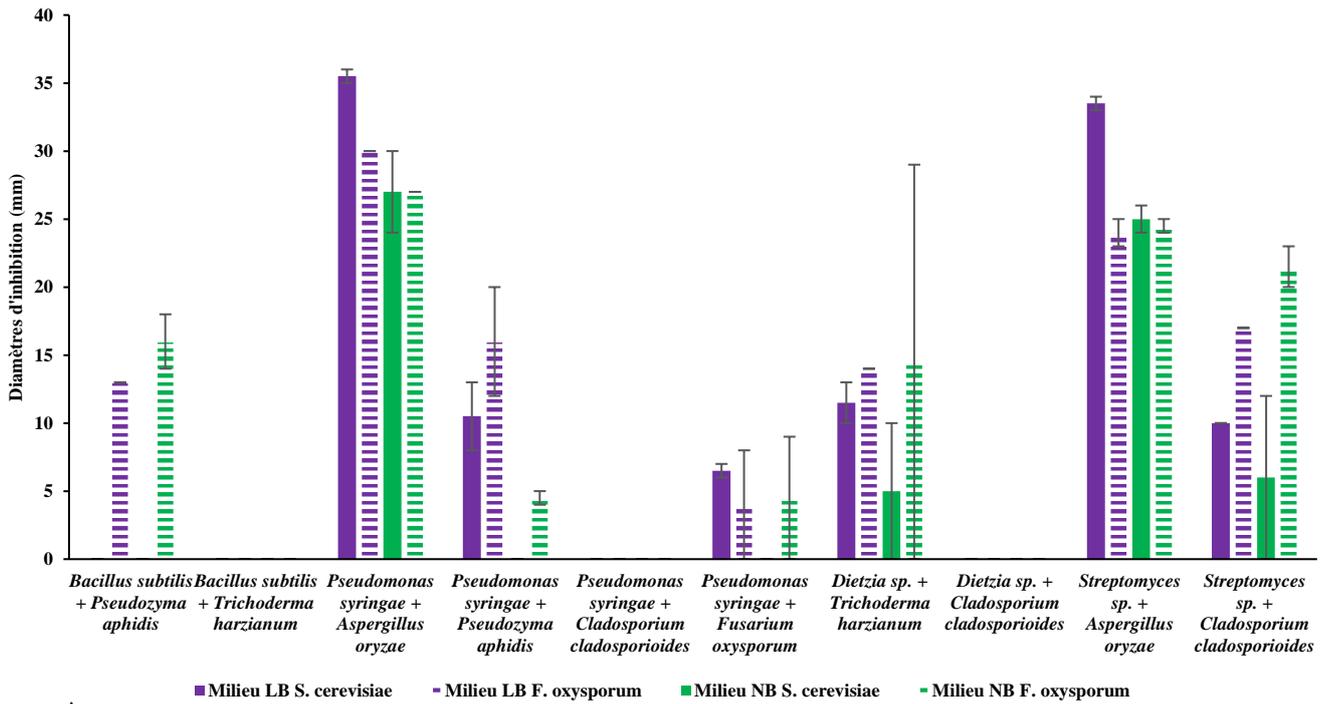
- *Streptomyces* sp. S0162 + *A. oryzae* UMIP 1042.72,
- *B. subtilis* ATCC 21332 + *P. aphidis* DSM 1247,
- *P. syringae* DSM 10604 + *A. oryzae* UMIP 1042.72,
- *P. syringae* DSM 10604 + *C. cladosporioides* PNF6,
- *P. syringae* DSM 10604 + *F. oxysporum* BR7,
- *Dietzia* sp. DM01 + *T. harzianum* Rifai MUCL 29707,
- *Streptomyces* sp. S0162 + *C. cladosporioides* PNF6,
- *B. subtilis* ATCC 21332 + *T. harzianum* Rifai MUCL 29707,
- *P. syringae* DSM 10604 + *P. aphidis* DSM 1247,

- *Dietzia* sp. DM01 + *C. cladosporioides* PNF6.

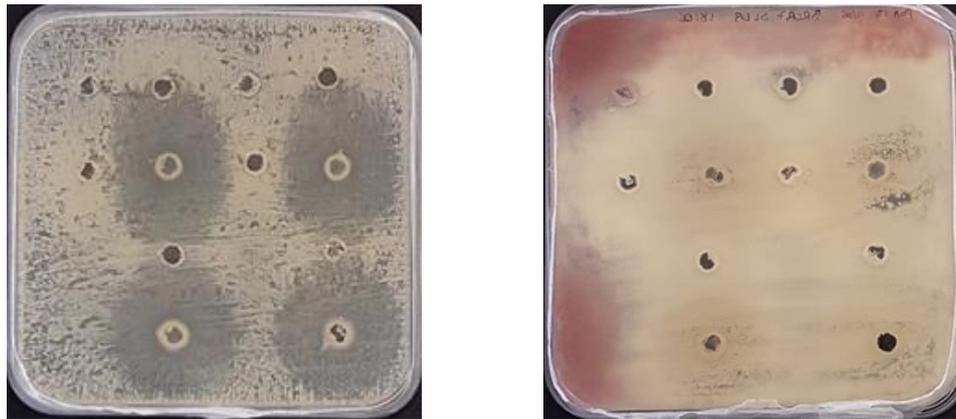
3.2 Criblage secondaire

3.2.1 Criblage secondaire des co-cultures sélectionnées

Les dix couples retenus à l'issue du criblage primaire en BioLector ont été cultivés en fioles de 250 mL dans des volumes de 50 mL, dans les milieux NB et LB et leur activité a été testée contre *F. oxysporum* et *S. cerevisiae*. Avec l'augmentation des volumes de culture, il a été possible de concentrer les surnageants par lyophilisation. Aussi tous les résultats présentés ici sont issus de surnageants concentrés 20 fois (Figure 22).



A



B

Figure 22 : **A)** Diamètres d'inhibition observés avec des surnageants concentrés (x 20) générés dans les milieux NB et LB contre *Saccharomyces cerevisiae* et *Fusarium oxysporum*. Les surnageants proviennent des dix co-cultures sélectionnées à l'issue du premier criblage (*Bacillus subtilis* + *Pseudozyma aphidis*, *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Cladosporium cladosporioides*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Dietzia sp.* + *Trichoderma harzianum*, *Dietzia sp.* + *Cladosporium cladosporioides*, *Streptomyces sp.* + *Aspergillus oryzae* et *Streptomyces sp.* + *Cladosporium cladosporioides*). **B)** Photos de boîtes de Petri utilisées pour cribler l'activité antifongique des

surnageants concentrés (cibles *Saccharomyces cerevisiae* à gauche et *Fusarium oxysporum* à droite).

Contre *S. cerevisiae*, des activités pour les co-cultures suivantes sont observées : *P. syringae* + *A. oryzae* (générée dans le milieu LB : 35,5 mm, dans le milieu NB : 27 mm), *P. syringae* + *P. aphidis* (Milieu LB : 10,5 mm), *P. syringae* + *F. oxysporum* (Milieu LB : 6,5 mm), *Dietzia* sp. + *T. harzianum* (Milieu LB : 11,5 mm, Milieu NB : 5 mm), *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (Milieu LB : 33,5 mm, Milieu NB : 25 mm) et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (Milieu LB : 10 mm, Milieu NB : 6 mm).

Les activités suivantes sont observées contre la cible *F. oxysporum*: *B. subtilis* + *P. aphidis* (Milieu LB : 13 mm, Milieu NB : 16 mm), *P. syringae* + *A. oryzae* (Milieu LB : 30 mm, Milieu NB : 27 mm), *P. syringae* + *P. aphidis* (Milieu LB : 16 mm, Milieu NB : 4,5 mm), *P. syringae* + *F. oxysporum* (Milieu LB : 4 mm, Milieu NB : 4,5 mm), *Dietzia* sp. + *T. harzianum* (Milieu LB : 14 mm, Milieu NB : 14,5 mm), *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (Milieu LB : 24 mm, Milieu NB : 24,5 mm) et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (Milieu LB : 17 mm, Milieu NB : 21,5 mm).

En revanche, même si ces co-cultures avaient montré une activité lors du criblage primaire en BioLector, *B. subtilis* + *T. harzianum*, *P. syringae* + *C. cladosporioides* et *Dietzia* sp. + *C. cladosporioides* ne montrent cette fois-ci aucune activité ni contre *S. cerevisiae*, ni contre *F. oxysporum*.

Sept couples sur les dix sélectionnés ont montré une activité dans les nouvelles conditions introduites ici. Afin de réduire le panel de couples testés dans le criblage secondaire, une sélection supplémentaire a été réalisée, sur la base d'un critère d'originalité.

3.2.2 Réflexion sur l'originalité des co-cultures

Des recherches de mots clés dans les moteurs de recherche de publication (Web of Science, SCOPUS, Google Scholar) ont été entreprises afin de garder à l'esprit le facteur d'originalité pour la sélection des couples les plus pertinents. Ces résultats étant très similaires en termes de conclusions, seuls les résultats de recherche dans WOS sont présentés ici.

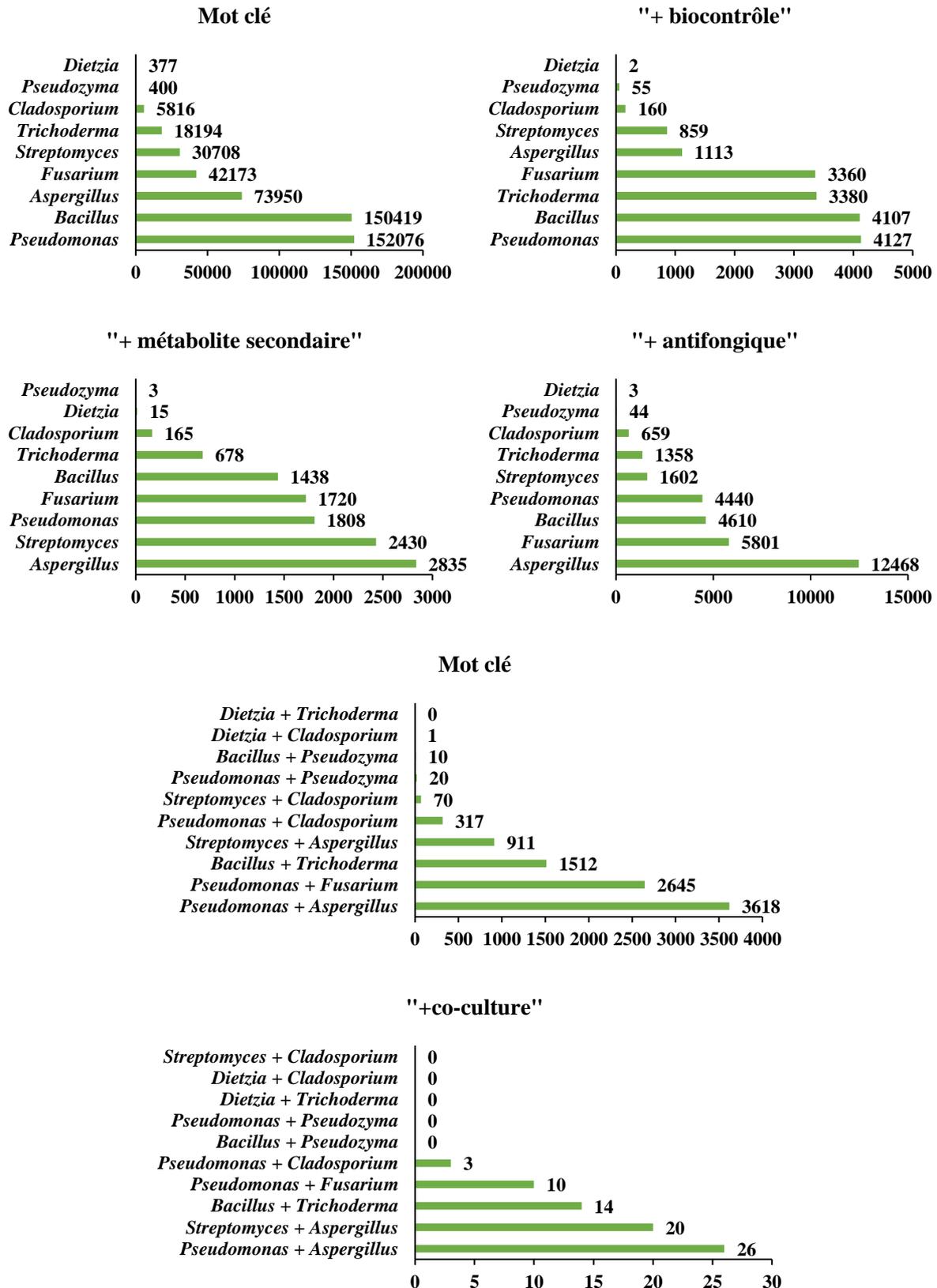


Figure 23 : Recherches par mots clés sur Web of Science (effectuées en juin 2021) : genres sélectionnés + mots clés choisis (« biocontrôle », « métabolite secondaire », « antifongique ») et co-cultures choisies + « co-culture ».

Ces recherches (Figure 23) montrent qu'un très grand nombre de publications sur WOS contiennent les mots clés *Bacillus* et *Pseudomonas* (plus de 150 000 résultats pour chaque genre), suivi par *Aspergillus* (plus de 70 000 résultats). Les genres ressortant dans le moins de résultats – et par conséquent les plus originaux – sont *Cladosporium* (5 816 résultats), *Pseudozyma* (400 résultats) et *Dietzia* (377 résultats). Si l'on ajoute le terme « biocontrôle » aux recherches de mots clés, *Bacillus* et *Pseudomonas* restent en tête (avec plus de 4 000 résultats chacun) suivi de près par *Trichoderma* et *Fusarium* (plus de 3 300 résultats chacun). Là encore, les genres les moins représentés sont *Cladosporium* (160 résultats), *Pseudozyma* (55 résultats) et *Dietzia* (2 résultats).

En s'intéressant à la description des métabolites secondaires produits par les différents genres retenus (« métabolite secondaire »), les genres *Aspergillus* et *Streptomyces* sont en tête (plus de 2800 et plus de 2400 résultats respectivement), suivis par *Pseudomonas* et *Fusarium* (1808 et 1720 résultats respectivement). Les mêmes trois genres se retrouvent en bas du classement (*Cladosporium* – 165 résultats, *Dietzia* – 15 résultats, *Pseudozyma* – 3 résultats). Enfin, avec le mot clé « antifongique », le genre *Aspergillus* arrive en tête (plus de 12 000 résultats), suivi par *Fusarium* (5 800 résultats). *Cladosporium* (659 résultats), *Pseudozyma* (44 résultats), *Dietzia* (3 résultats) sont encore les genres apparaissant le moins dans la recherche.

La recherche des genres associés révèle que les « couples » les plus étudiés dans la littérature impliquent le plus souvent un des genres les plus étudiés en général et en biocontrôle (*Pseudomonas*, *Bacillus* et *Trichoderma*) et un des genres les plus recherchés en antifongique (*Aspergillus* et *Fusarium*). Aussi, les trois couples les plus représentés sont *Pseudomonas* + *Aspergillus* (plus de 3 600 résultats), *Pseudomonas* + *Fusarium* (plus de 2 600 résultats) et *Bacillus* + *Trichoderma* (plus de 1 500 résultats). *Dietzia* + *Cladosporium* (1 résultat) et *Dietzia* + *Trichoderma* (aucun résultat) arrivent en dernier. En ajoutant le terme « co-culture » à ces couples, les couples arrivant en premier sont *Pseudomonas* + *Aspergillus* (26 résultats) et *Streptomyces* + *Aspergillus* (20 résultats), qui sont les deux couples les plus performants du criblage primaire et du criblage secondaire. En outre, cinq couples ne présentent aucun résultat de recherche : *Bacillus* + *Pseudozyma*, *Pseudomonas* + *Pseudozyma*, *Dietzia* + *Trichoderma*, *Dietzia* + *Cladosporium* et *Streptomyces* + *Cladosporium* ; cela est en accord avec le fait que les genres *Cladosporium*, *Pseudozyma* et *Dietzia* ne présentaient que très peu de résultats même sans mots clés supplémentaires.

A l'issue de ces travaux révélant l'originalité des co-cultures, l'étude a été poursuivie avec une validation du criblage secondaire, avec des conditions de culture légèrement différentes

(volumes plus importants, agitation et humidité modifiées). Les cultures montrant une activité intéressante, c'est-à-dire contre les deux cibles, dans au moins une condition de milieu, sont celles qui ont été gardées par la suite.

Après ces tests d'activité supplémentaires, six couples ont été choisis en fonction de l'intensité de leur activité contre *S. cerevisiae* et *F. oxysporum*, et de l'originalité des souches considérées (se concentrant ainsi en particulier sur les souches environnementales) : *P. syringae* + *P. aphidis*, *P. syringae* + *A. oryzae*, *P. syringae* + *F. oxysporum*, *Dietzia* sp. + *T. harzianum*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, avec ainsi les deux couples les plus performants (*P. syringae* + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*) qui sont également les plus représentés dans la littérature, un couple avec deux genres très décrits (*P. syringae* + *F. oxysporum*) mais avec une souche environnementale de *Fusarium oxysporum*, et trois couples qui seraient totalement nouveaux d'après les recherches effectuées : *P. syringae* + *P. aphidis*, *Dietzia* sp. + *T. harzianum* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*.

3.3 Validation du criblage secondaire pour des activités antifongiques

3.3.1 Suivi du développement des microorganismes

Pour toutes les monocultures et co-cultures décrites dans cette partie, un suivi visuel du développement des microorganismes a été réalisé. Il est ainsi possible de commenter sur le développement différentiel ou non des microorganismes en co-culture.

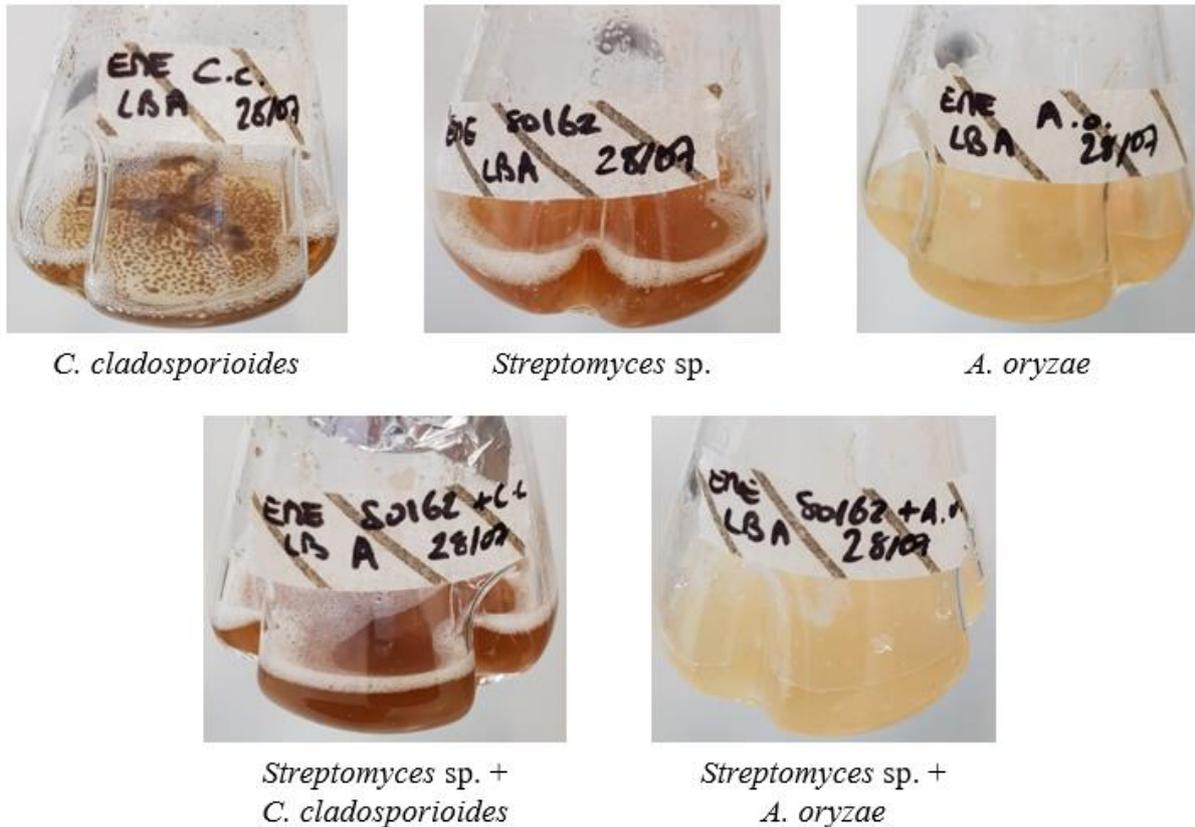


Figure 24 : Exemple de développement de monocultures (*Cladosporium cladosporioides* PNF6, *Streptomyces* sp. S0162 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72) et de co-cultures (*Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*) après 5 jours de croissance en milieu LB.

La figure 24 montre des exemples de croissance des différentes mono- et co-cultures en milieu LB. En particulier, dans les exemples décrits, *C. cladosporioides* PNF6 s'est développé sous forme de pellets d'une taille d'environ 3 mm et d'un marron-vert sombre, et a légèrement coloré le milieu. *Streptomyces* sp. S0162 a montré un développement sous forme de pellets blancs de très petite taille (< 1 mm) et a coloré le milieu d'une teinte ambrée. Enfin, *A. oryzae* UMIP 1042.72 a montré un développement sous forme de pellets blancs irréguliers, de taille pouvant aller jusqu'à plus de 5 mm. En ce qui concerne les co-cultures, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* a montré un développement très similaire à *Streptomyces* sp. S0162 avec une coloration légèrement différente (plus ou moins marron) et la présence de pellets blancs plus gros (de plusieurs mm de long) et irréguliers. Le développement de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* observé ressemble fortement à *A. oryzae* UMIP 1042.72, avec la présence additionnelle de pellets de très petite taille (<< 1 mm).

Les développements observés sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Développement des co-cultures après 5 jours de culture dans les milieux LB et NB.

Culture	Milieu LB	Milieu NB
<i>P. syringae</i> + <i>P. aphidis</i>	Aspect indifférenciable des monocultures	Aspect indifférenciable des monocultures
<i>P. syringae</i> + <i>A. oryzae</i>	Développement privilégié d' <i>A. oryzae</i>	Développement des deux partenaires
<i>P. syringae</i> + <i>F. oxysporum</i>	Développement privilégié de <i>F. oxysporum</i>	Développement privilégié de <i>F. oxysporum</i>
<i>Dietzia</i> sp. + <i>T. harzianum</i>	Développement des deux partenaires	Développement privilégié de <i>T. harzianum</i>
<i>Streptomyces</i> sp. + <i>A. oryzae</i>	Développement privilégié d' <i>A. oryzae</i>	Développement privilégié d' <i>A. oryzae</i>
<i>Streptomyces</i> sp. + <i>C. cladosporioides</i>	Développement privilégié de <i>Streptomyces</i> sp.	Développement privilégié de <i>Streptomyces</i> sp.

Globalement, les comportements des co-cultures sont similaires dans les deux milieux. Dans certaines co-cultures, un seul des deux partenaires présente un développement majoritaire ; il s'agit pour la plupart des couples du partenaire fongique (*F. oxysporum*, *A. oryzae*, ou *T. harzianum*). Dans le cas de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, c'est le partenaire bactérien qui prend le dessus, comme ce qui a pu être vu sur la figure 24. Un développement des deux partenaires est observé pour *Dietzia* sp. + *T. harzianum* en milieu LB et pour *P. syringae* + *A. oryzae* en milieu NB.

3.3.2 Tests d'activité antifongique en milieu gélosé

a. Premiers tests d'activité antifongique en milieu gélosé

Les six couples sélectionnés ont été cultivés en fioles en milieu LB et NB, dans un volume de 50 mL comme les tests réalisés en 3.2.1. Les surnageants générés ont été concentrés 5, 10, ou 20 fois et des tests antifongiques ont ensuite été réalisés.

Avec les deux milieux utilisés, les surnageants de monoculture de *Dietzia* sp. DM01 et *T. harzianum* Rifai MUCL 29707 ainsi que ceux de la co-culture *Dietzia* sp. + *T. harzianum* n'ont montré aucune activité contre les cibles considérées. Aussi ces surnageants ne seront pas

discutés dans cette partie ; seuls les cinq couples ayant montré une activité ainsi que leurs monocultures respectives sont présentés dans la figure 25.

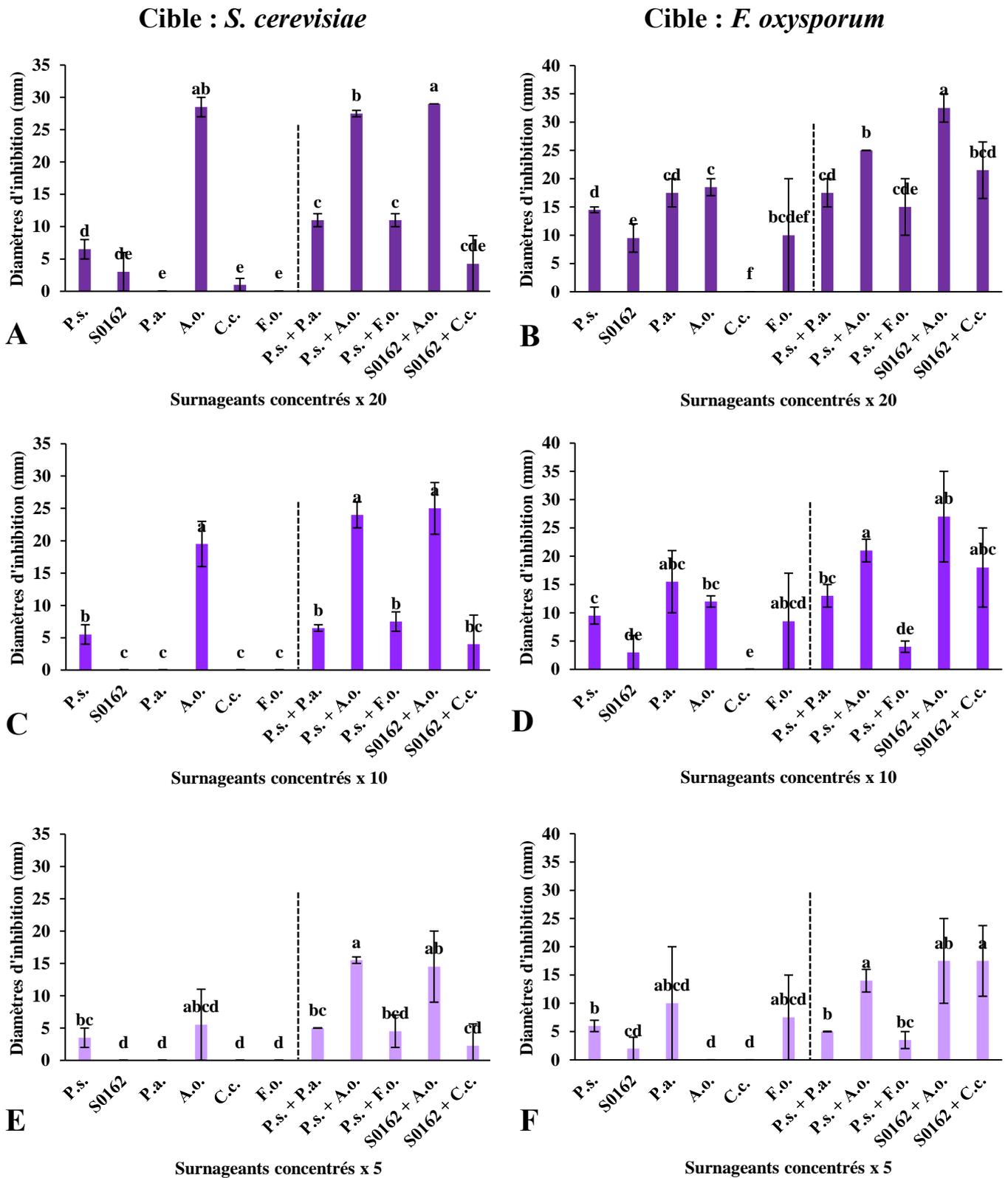


Figure 25 : Diamètres d'inhibition (mm) des différents surnageants filtrés et concentrés (x 20 - **A, B** ; x 10 - **C, D** ; et x 5 - **E, F**) des cultures réalisées en milieu LB (les monocultures : *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6, *Fusarium oxysporum* BRCR7 et les co-cultures : *Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) contre *Saccharomyces cerevisiae* (**A, C, E**) et *Fusarium oxysporum* (**B, D, F**) sur des plaques de gélose PDA. Des lettres différentes (a-f) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student).

Dans les figures 25A, C et E, une activité contre *S. cerevisiae* a été observée avec la majorité des surnageants concentrés. Une augmentation de la taille des diamètres d'inhibition peut être observée en fonction de l'augmentation de la concentration du surnageant, tant pour les co-cultures que pour les monocultures. Quatre des six monocultures testées présentent une activité contre *S. cerevisiae* dans les conditions choisies : *P. syringae* DSM 10604 (3,5-5,5-6,5 mm), *Streptomyces* sp. S0162 (3 mm), *A. oryzae* UMIP 1042.72 (5,5-19,5-28,5 mm) et *C. cladosporioides* PNF6 (1 mm). De nombreuses co-cultures ont également présenté des activités inhibitrices contre *S. cerevisiae*. Pour deux couples en particulier, des différences significatives ($P < 0,1$) ont été observées par rapport aux monocultures : *P. syringae* + *P. aphidis* (5,0-6,5-11,0 mm), *P. syringae* + *F. oxysporum* (4,5-7,5-11,0 mm). La co-culture de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (2,3-4,0-4,3 mm) montre cependant des résultats relativement similaires à la monoculture de *Streptomyces* sp. seule, avec une activité qui persiste encore avec la diminution de la concentration. *P. syringae* + *A. oryzae* (15,5-24,0-27,5 mm) et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (14,5-25,0-29,0 mm) présentent des activités similaires à celles de *A. oryzae* seul, mais les diamètres d'inhibition sont plus grands à des concentrations plus faibles.

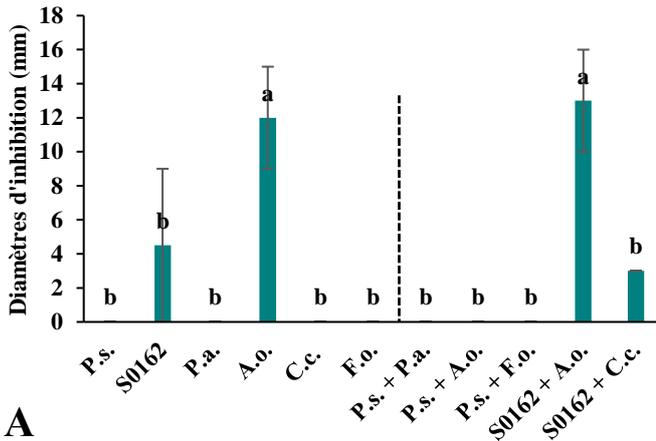
En ce qui concerne l'activité contre *F. oxysporum* (25B, D et F), alors qu'aucune activité n'a été observée pour *C. cladosporioides* PNF6, toutes les autres monocultures et co-cultures ont montré une activité antifongique (fongistatique) : *P. syringae* DSM 10604 (6-9,5-14,5 mm), *P. aphidis* DSM 1247 (10-15,5-17,5 mm), *A. oryzae* UMIP 1042.72 (12-18,5 mm), *F. oxysporum* BRCR7 (7,5-8,5-10 mm) et *Streptomyces* sp. S0162 (2-3-9,5 mm). Des différences significatives ($P < 0,1$) pour les co-cultures suivantes (par rapport à leurs monocultures respectives) peuvent être observées : *P. syringae* + *A. oryzae* (14-21-25 mm), *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (17,5-18-21,5 mm) et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (17,5-27-32,5 mm).

L'activité la plus intense contre *F. oxysporum* est donc observée avec la co-culture de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*. Tant cette co-culture que celle de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* présentent une activité plus importante que l'activité combinée des monocultures correspondantes, ce qui est particulièrement remarquable pour cette dernière co-culture où *C. cladosporioides* seul ne présente aucune activité contre *F. oxysporum*.

Une activité synergique de l'association de monocultures en co-cultures a pu être déduite de ces résultats, notamment pour *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* contre *F. oxysporum*. Dans les concentrations inférieures de surnageant, cette synergie peut également être notée pour *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (14,5 mm) et *P. syringae* + *A. oryzae* (15,5) à une concentration x 5. Pour les concentrations plus élevées et l'activité montrée contre *S. cerevisiae*, l'effet de la co-culture semble être additif plutôt que synergique.

Des tests ont également été réalisés avec les surnageants générés dans le milieu NB. Cependant, l'activité observée est moins intense et dans le cas de la cible *S. cerevisiae*, seuls les couples *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* ont montré une activité.

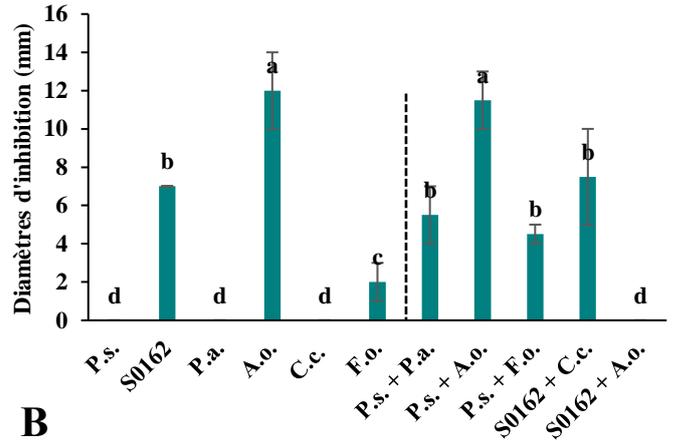
Cible : *S. cerevisiae*



A

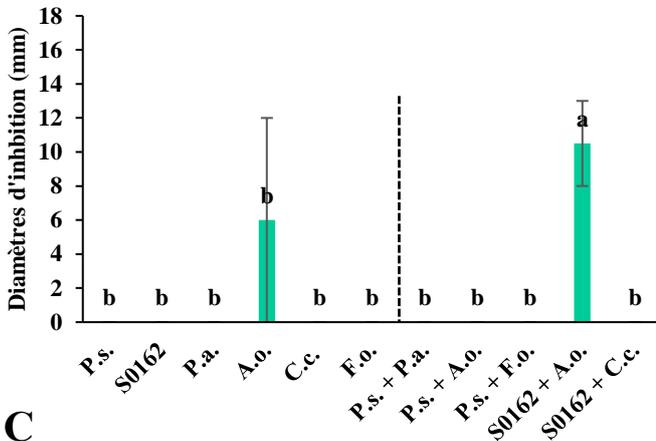
Surnageants concentrés x 20

Cible : *F. oxysporum*



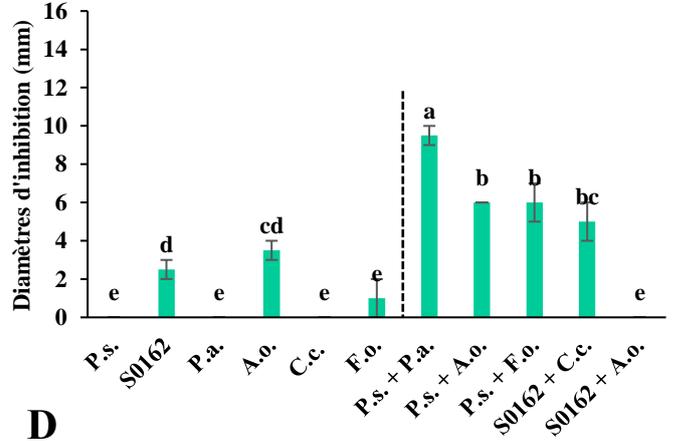
B

Surnageants concentrés x20



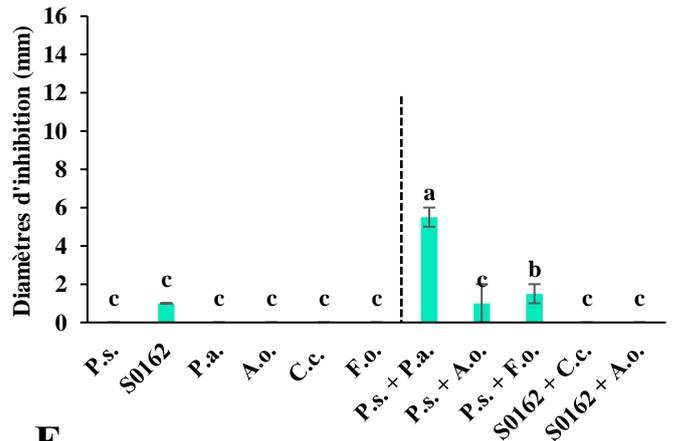
C

Surnageants concentrés x 10



D

Surnageants concentrés x10



E

Surnageants concentrés x5

Figure 26 : Diamètres d'inhibition (mm) des différents surnageants filtrés et concentrés (x20 - **A, B** ; x10 - **C, D** ; et x5 - **E**) des cultures réalisées en milieu NB (les monocultures : *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6, *Fusarium oxysporum* BRCCR7 et les co-cultures : *Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) contre *Saccharomyces cerevisiae* (**A, C**) et *Fusarium oxysporum* (**B, D, E**) sur des plaques de gélose PDA. Des lettres différentes (a-f) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student).

Dans les figures 26A et C, les activités contre *S. cerevisiae* sont en effet moindres, en outre, il n'y a aucune activité en-dessous de la concentration x 10. Seuls *Streptomyces* sp. S0162, *A. oryzae* UMIP 1042.72, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* montrent une activité à la concentration x 20. *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (13-10,5 mm) présente la plus forte activité, mais qui n'est significativement différente que de *Streptomyces* sp. seul (4,5-0 mm), et d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 (12-6 mm) à la concentration x 10. En ce qui concerne *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (3-0 mm), son activité est significativement différente de *C. cladosporioides* PNF6 seul (0-0 mm) mais pas de *Streptomyces* sp. (4,5-0 mm).

Dans les figures 26B, C et E, une absence d'activité est remarquée pour *P. syringae* DSM 10604, *P. aphidis* DSM 1247, *C. cladosporioides* PNF6 et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, quelle que soit la concentration. Parmi les co-cultures présentant une activité, *P. syringae* + *A. oryzae* (11,5-6-1 mm) et *P. syringae* + *P. aphidis* (5,5-9,5-5,5 mm) présentent les meilleures activités, significativement différentes des deux partenaires correspondants (*P. syringae* DSM 10604, *A. oryzae* UMIP 1042.72 – 12-3,5-0 mm – et *P. aphidis* DSM 1247 respectivement) à la concentration x 10 et la concentration x 5 pour *P. syringae* + *P. aphidis* et présentant une tendance à être supérieures aux autres concentrations. La co-culture *P. syringae* + *F. oxysporum* (4,5-6-1,5 mm), bien que présentant une activité plus faible, est significativement supérieure à *P. syringae* DSM 10604 et *F. oxysporum* BRCCR7 seuls (2-1-0 mm). Enfin, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (7,5-5-0 mm) est significativement différent de *C. cladosporioides* PNF6 seul aux concentrations x 20 et x 10, et de *Streptomyces* sp. S0162 à la concentration x 10.

Dans la condition de milieu NB, les co-cultures présentant une activité antifongique synergique ne sont observables que contre *F. oxysporum* et sont *P. syringae* + *P. aphidis* et *P. syringae* + *F. oxysporum*.

L'étape de microfermentation a permis de cribler plusieurs conditions de milieu en parallèle et d'observer les activités antifongiques avec des surnageants de culture filtrés, ramenant le nombre de co-cultures d'intérêt de vingt-cinq à treize. Cinq co-cultures ont été sélectionnées pour une mise à l'échelle en fioles et un test d'activité antifongique avec des surnageants concentrés. Les co-cultures les plus prometteuses résultant de cette étude sont *P. syringae* + *P. aphidis*, *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, dans la condition de milieu LB, qui sont la plupart des co-cultures testées et quatre des treize premières sélectionnées après l'étape de microfermentation. Elles ont toutes présenté une activité constante contre *F. oxysporum*, qui était un critère discriminant, et contre *S. cerevisiae*.

b. Seconds tests antifongiques en milieu gélosé

A l'issue des tests d'activité antifongique réalisés en milieu NB et LB, le milieu retenu a été le LB. Des nouveaux tests d'activité ont été réalisés afin d'affiner le processus de décision. Les conditions de culture ont été modifiées dans un souci de répétabilité (culture de 50 mL dans une fiole de 500 mL contre 50 mL dans 250 mL précédemment).

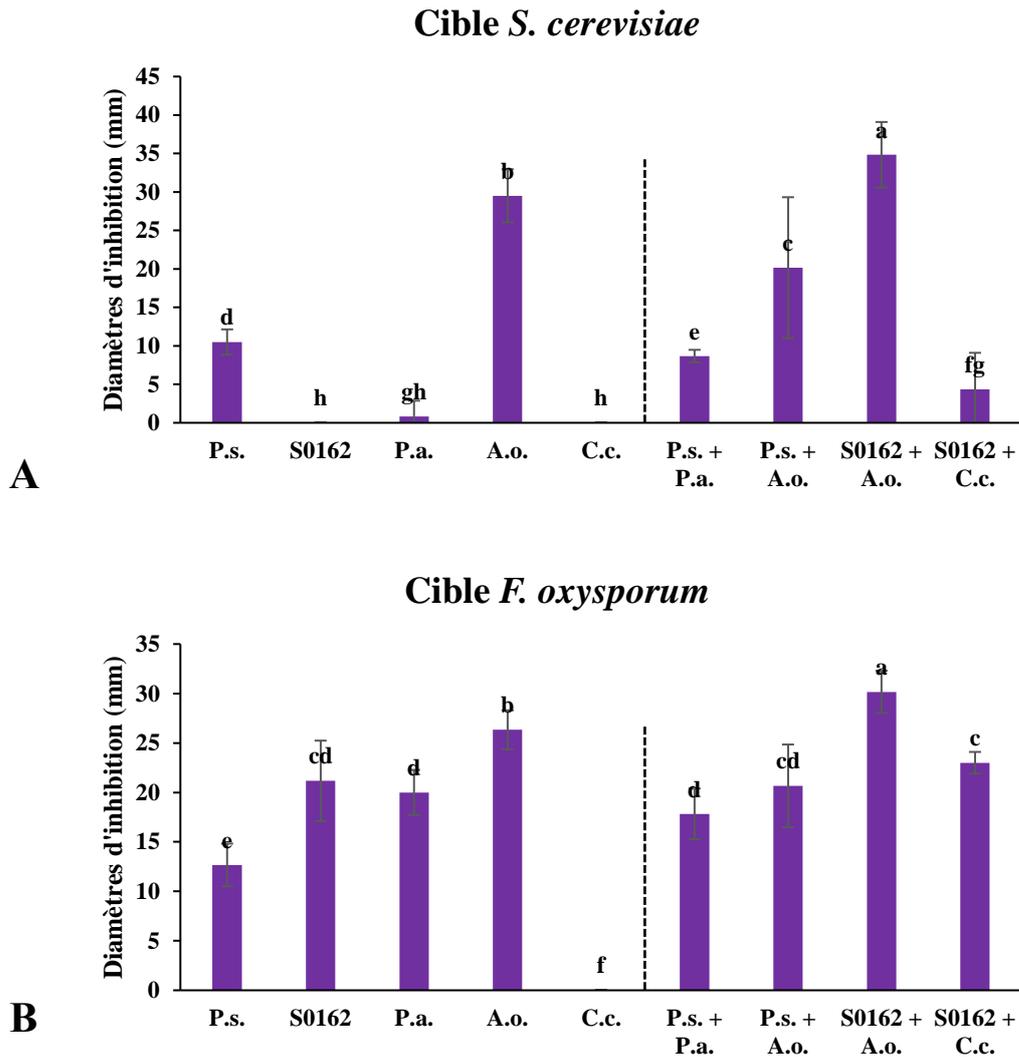


Figure 27 : Diamètres d'inhibition (mm) des différents surnageants filtrés et concentrés (x 20) des cultures réalisées **en milieu LB** (les monocultures : *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162, *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et les co-cultures : *Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) contre *Saccharomyces cerevisiae* (A) et *Fusarium oxysporum* (B) sur des plaques de gélose PDA. Des lettres différentes (a-h) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,05$, test de Student).

Dans ce test supplémentaire réalisé avec les quatre couples retenus à la fin du criblage afin de les départager sur la base de leur activité (Figure 27), une différence moins marquée est observée entre les co-cultures et les monocultures. Ce comportement est peut-être dû au changement de volume de fiole, qui a changé la surface de contact du milieu avec l'air ainsi que le paramètre d'agitation.

Contre *S. cerevisiae*, *Streptomyces* sp. S0162 et *C. cladosporioides* PNF6 ne présentent aucune activité ; la co-culture *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* est active contre *S. cerevisiae* (4,3 mm) et est significativement différente des monocultures. Les co-cultures présentant les meilleures activités sont *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (34,8 mm) qui est significativement supérieure à *A. oryzae* UMIP 1042.72 (29,5 mm) et *Streptomyces* sp ; *P. syringae* + *A. oryzae* (20,2 mm) qui est significativement inférieure à *A. oryzae* UMIP 1042.72 seul, bien que significativement supérieure à celle des bactéries (*P. syringae* DSM 10604 – 10,5 mm). *P. syringae* + *P. aphidis* (8,7 mm) présente une activité significativement inférieure à celle de *P. syringae* DSM 10604, et une activité significativement supérieure à celle de *P. aphidis* DSM 1247 (0,8 mm).

Contre *F. oxysporum*, *C. cladosporioides* PNF6 n'a, une fois encore, montré aucune activité. Les meilleures performances se retrouvent chez *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (30,2 mm), chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 (26,3 mm) et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (23 mm). L'activité sur boîte de la première co-culture est encore significativement supérieure à celles d'*A. oryzae* et *Streptomyces* sp. (21,2 mm) ; pour la deuxième co-culture, elle n'est pas significativement différente de *Streptomyces* sp. S0162 mais significativement supérieure à *C. cladosporioides* PNF6. La même observation peut être faite pour les co-cultures *P. syringae* + *A. oryzae* (20,1 mm), moins performante qu'*A. oryzae* UMIP 1042.72 mais significativement supérieure à *P. syringae* DSM 10604 (12,7 mm), et *P. syringae* + *P. aphidis* (17,8 mm), qui est uniquement supérieure à *P. syringae* DSM 10604 significativement (*P. aphidis* DSM 1247 – 20 mm).

Pour toutes les co-cultures testées, une activité répétable mais pas nécessairement supérieure à celle observée en monocultures est confirmée : seule l'activité *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* demeure significativement supérieure à celle des monocultures.

Au vu des résultats observés dans les deux séries de tests d'activité antifongique réalisés avec six puis quatre couples de microorganismes, il a été décidé de garder trois couples : *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *P. syringae* + *A. oryzae* sur la base de la connaissance sur ces couples ainsi que de leur activité, que ce soit contre *S. cerevisiae* ou contre *F. oxysporum*, mais aussi *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, qui a montré une activité synergique dans la condition de fioles de 250 mL et une activité à tendance supérieure aux monocultures contre *F. oxysporum*. *P. syringae* + *P. aphidis* présente également un intérêt, cependant le couple n'a pas été retenu pour la suite des expériences afin de se focaliser sur les couples les plus performants.

3.3.3 Suivi du développement des microorganismes en mono- et co-culture par mesure de matière sèche

a. Première étape

En parallèle des tests d'activité nécessitant la génération de surnageants, la masse sèche des différentes cultures a été mesurée en fin de culture, afin de déterminer s'il y avait des différences entre les monocultures et les co-cultures au niveau du développement, et si cela avait un lien éventuel avec les activités antifongiques observées.

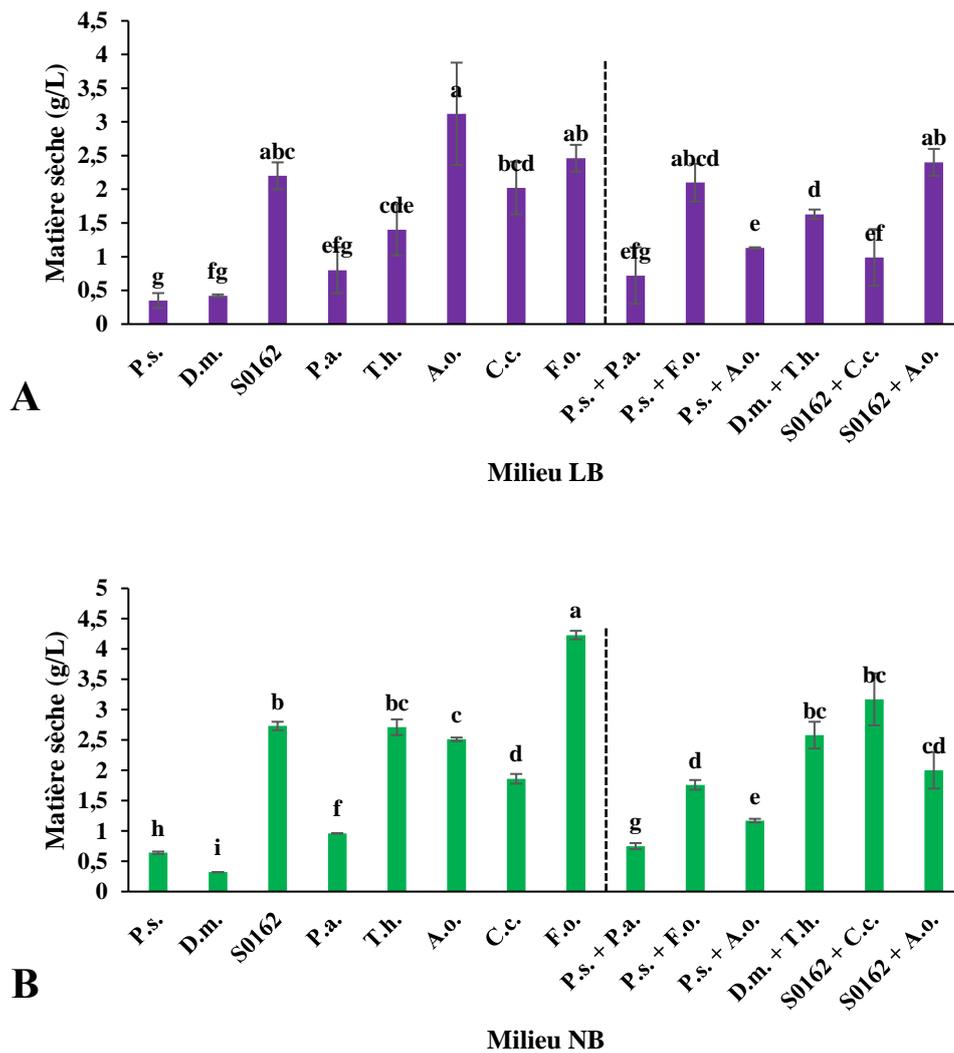


Figure 28 : Matières sèches (g/L) obtenues à l'issue des mono (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Dietzia* sp. + *Trichoderma*

harzianum, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*) générées en milieu LB (A) et NB (B). Des lettres différentes (a-i) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student).

Sur la figure 28, des développements différentiels peuvent être notés selon les milieux, avec globalement des moyennes de matière sèche plus élevées dans le milieu NB, culminant à 4,23 g/L pour *F. oxysporum* BRCR7 en milieu NB (contre 2,46 g/L pour la même souche en milieu LB) et à 3,12 g/L pour *A. oryzae* UMIP 1042.72 en milieu LB (contre 2,51 g/L pour la même souche en milieu NB). Une plus grande variabilité des matières sèches est en outre observée dans le milieu LB.

Dans le milieu LB, les co-cultures présentent toutes une masse sèche inférieure ou égale à celle du champignon impliqué mais supérieure à celle de la bactérie, sauf dans le cas de la co-culture *Dietzia* sp. + *T. harzianum* (1,63 g/L), où la masse sèche est significativement supérieure à celle de *Dietzia* sp. DM01 (0,42 g/L) et montre une tendance à être supérieure à celle de *T. harzianum* Rifai MUCL 29707 (1,40 g/L) et dans celui de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (0,99 g/L) dont la masse sèche est inférieure à celle de *Streptomyces* sp. S0162 (2,20 g/L) et *C. cladosporioides* PNF6 (2,02 g/L). Dans le milieu NB, la même tendance est observée, avec cependant *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (2 g/L) qui présente une masse sèche inférieure aux monocultures respectives *Streptomyces* sp. S0162 (2,73 g/L) et *A. oryzae* UMIP 1042.72 (2,51 g/L) et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (3,17 g/L) qui présente une masse sèche supérieure à *Streptomyces* sp. S0162 et *C. cladosporioides* PNF6 (1,86 g/L). Généralement, dans les co-cultures, le champignon se développe moins bien qu'en monoculture.

Les surnageants qui ont montré l'activité la plus intense dans le milieu LB par exemple sont *A. oryzae* UMIP 1042.72, *P. syringae* + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* contre *S. cerevisiae* et *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* contre *F. oxysporum*. Au niveau du développement de ces microorganismes et co-cultures, *A. oryzae* UMIP 1042.72 présente le meilleur développement, et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (2,40 g/L) présente un bon développement bien qu'inférieur à celui d'*A. oryzae* seul. *P. syringae* + *A. oryzae* (1,13 g/L) et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* présentent une masse sèche beaucoup plus faible. Globalement la présence d'activité n'apparaît pas corrélée à la quantité de microorganismes qui s'est développée mais bien à une interaction entre le microorganisme et le milieu, voire son partenaire de culture dans le cas des co-cultures.

b. Deuxième étape

De la même façon que pour les tests en milieu gélosé, les mesures de matière sèche ont été répétées avec les couples sélectionnées lors de la première phase de tests, cultivés dans 50 mL de milieu LB dans une fiole de 500 mL.

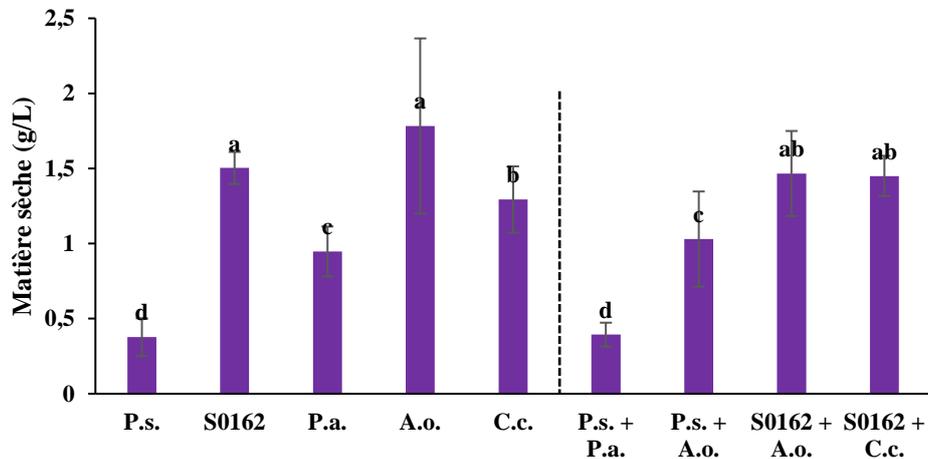


Figure 29 : Matières sèches (g/L) obtenues à l'issue des mono (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, et *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) générées **en milieu LB**. Des lettres différentes (a-d) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,05$, test de Student).

Le milieu LB, dans lequel les co-cultures et monocultures ont montré les meilleures activités, demeure un milieu où il y a beaucoup de variabilité de développement (figure 29). Cela est particulièrement vrai pour *A. oryzae* UMIP 1042.72, qui reste le microorganisme qui se développe le mieux dans le milieu LB même avec le changement de condition (1,78 g/L). Les mêmes observations que dans la partie précédente peuvent être faites, avec cependant un meilleur développement de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (1,47 g/L) qui montre une masse sèche proche et non significativement différente de *Streptomyces* sp. S0162 (1,50 g/L) et d'*A. oryzae* UMIP 1042.72. Globalement, un développement moins important des microorganismes est en outre observé, ce qui semble être directement causé par le changement de volume de fiole et d'agitation, aucun autre paramètre n'ayant été modifié.

3.4 Tests d'activité antifongique en milieu liquide

3.4.1 Première phase de tests

En parallèle des tests d'activité antifongique sur milieu gélosé, des tests en milieu liquide ont été réalisés. Tout d'abord sur la première sélection de couples après criblage primaire : *P. syringae* + *P. aphidis*, *P. syringae* + *A. oryzae*, *P. syringae* + *F. oxysporum*, *T. harzianum* + *Dietzia* sp., *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* dans les milieux riches LB et NB (Figure 30).

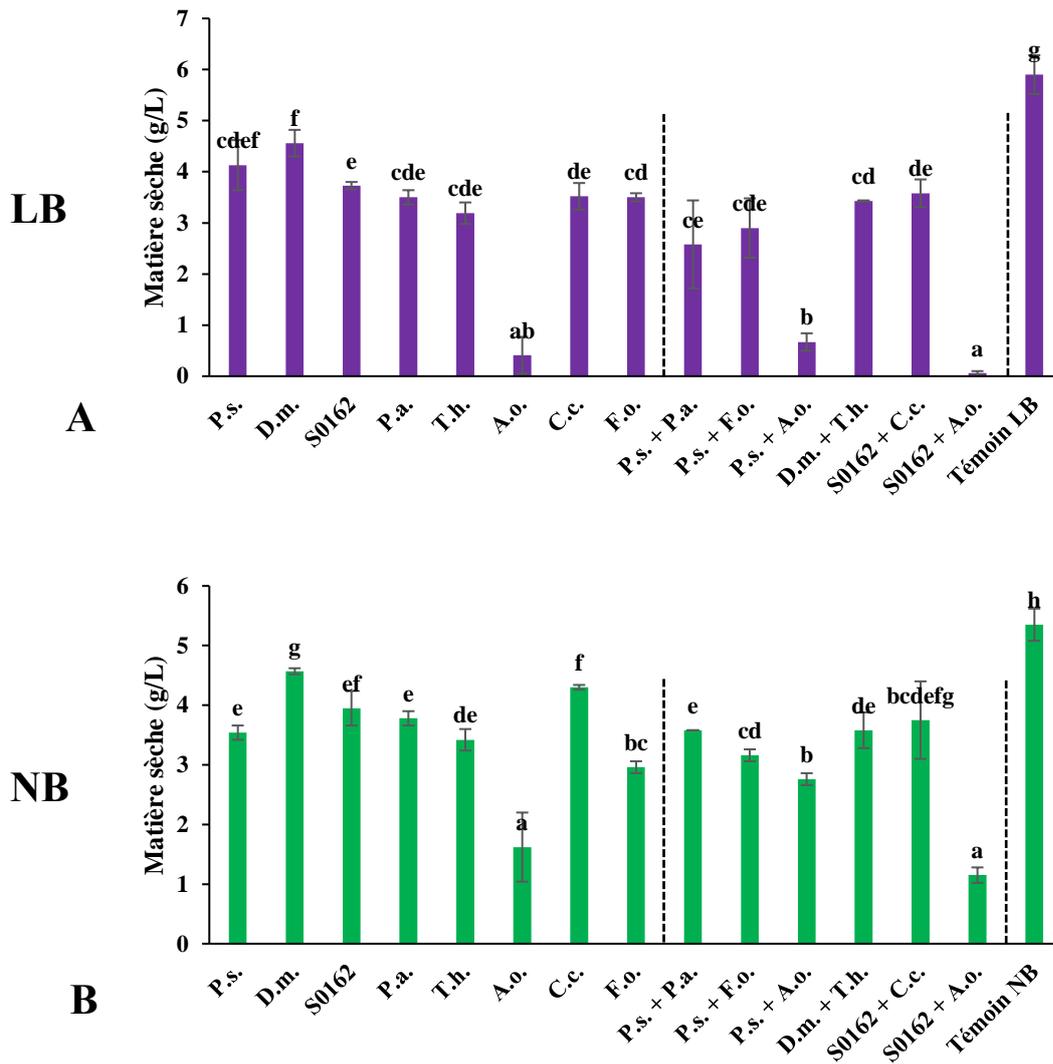


Figure 30 : Matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 5 jours à l'issue des tests d'activité antifongique en milieu liquide à partir de surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium*

cladosporioides PNF6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Dietzia* sp. + *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*) générés dans les milieux **LB (A)** et **NB (B)** et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu PDB. Des lettres différentes (a-h) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,10$, test de Student).

Une matière sèche plus faible de *F. oxysporum* BRCR7 à l'issue du test résulte d'un développement moindre du champignon et donc d'une activité du surnageant. Que ce soit en milieu LB ou NB, une forte activité est observée pour *A. oryzae* UMIP 1042.72 (LB : 0,41 g/L, NB : 1,62 g/L) et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (LB : 0,06 g/L, NB : 1,15 g/L) ; le développement de *F. oxysporum* est toujours significativement inférieur à celui observé pour toutes les autres cultures, à part *P. syringae* + *A. oryzae* mais uniquement en milieu LB (LB : 0,67 g/L, NB : 2,76 g/L). Le surnageant de *F. oxysporum* BRCR7 semble présenter une légère activité contre *F. oxysporum* en milieu NB (LB : 3,50 g/L, NB : 2,96 g/L) en comparaison avec le reste. Le surnageant qui présente le moins d'activité est celui de *Dietzia* sp. DM01, pour lequel *F. oxysporum* montre le plus de développement tous surnageants confondus (LB : 4,56 g/L, NB : 4,57 g/L).

Aucune co-culture ne présente d'activité significativement différente de ses deux monocultures constituantes dans ce test : le développement de *F. oxysporum* BRCR7 en présence du surnageant de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* montre seulement une tendance à être inférieur à *A. oryzae* et est significativement inférieur à *Streptomyces* sp. S0162 (LB : 3,73 g/L, NB : 3,95 g/L) tous milieux confondus. Le développement de *F. oxysporum* en présence des surnageants de *P. syringae* + *P. aphidis* (2,58 g/L) et *P. syringae* + *F. oxysporum* (2,90 g/L) générés en milieu LB, montre une tendance à être inférieur aux monocultures constitutives (*P. syringae* DSM 10604 : 4,13 g/L, *P. aphidis* DSM 1247 : 3,50 g/L, *F. oxysporum* BRCR7 : 3,50 g/L).

Globalement, les activités sont plus marquées, comme en milieu gélosé, avec les surnageants générés en milieu LB. Ce qui ressort également de ces tests est la forte efficacité d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 et des co-cultures l'impliquant, notamment *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*. Tous les surnageants semblent présenter une activité antifongique contre *F. oxysporum* BRCR7 (matière sèche significativement différente des témoins LB – 5,90 g/L et NB – 5,35 g/L) mais cela pourrait également être dû à un épuisement du milieu.

Le pourcentage d'inhibition a pu être calculé à partir des formules suivantes :

$$\text{Pourcentage inhibition} = \left(1 - \frac{MS \text{ surnageant}}{MS \text{ milieu}}\right) * 100$$

Propagation d'erreur

$$= \left(\frac{100}{MS \text{ milieu}} * ET \text{ surnageant}\right) + \left(\frac{100 * MS \text{ surnageant}}{MS \text{ milieu}^2} * ET \text{ milieu}\right)$$

Avec MS surnageant : la moyenne des matières sèches de *F. oxysporum* BR7 obtenues en présence des différents surnageants de mono- et co-cultures et ET surnageant : l'écart type de cette moyenne, MS milieu : la moyenne des matières sèches obtenues avec le témoin (LB ou NB) et ET milieu : l'écart type de cette moyenne. Les pourcentages d'inhibition sont présentés dans la figure 31.

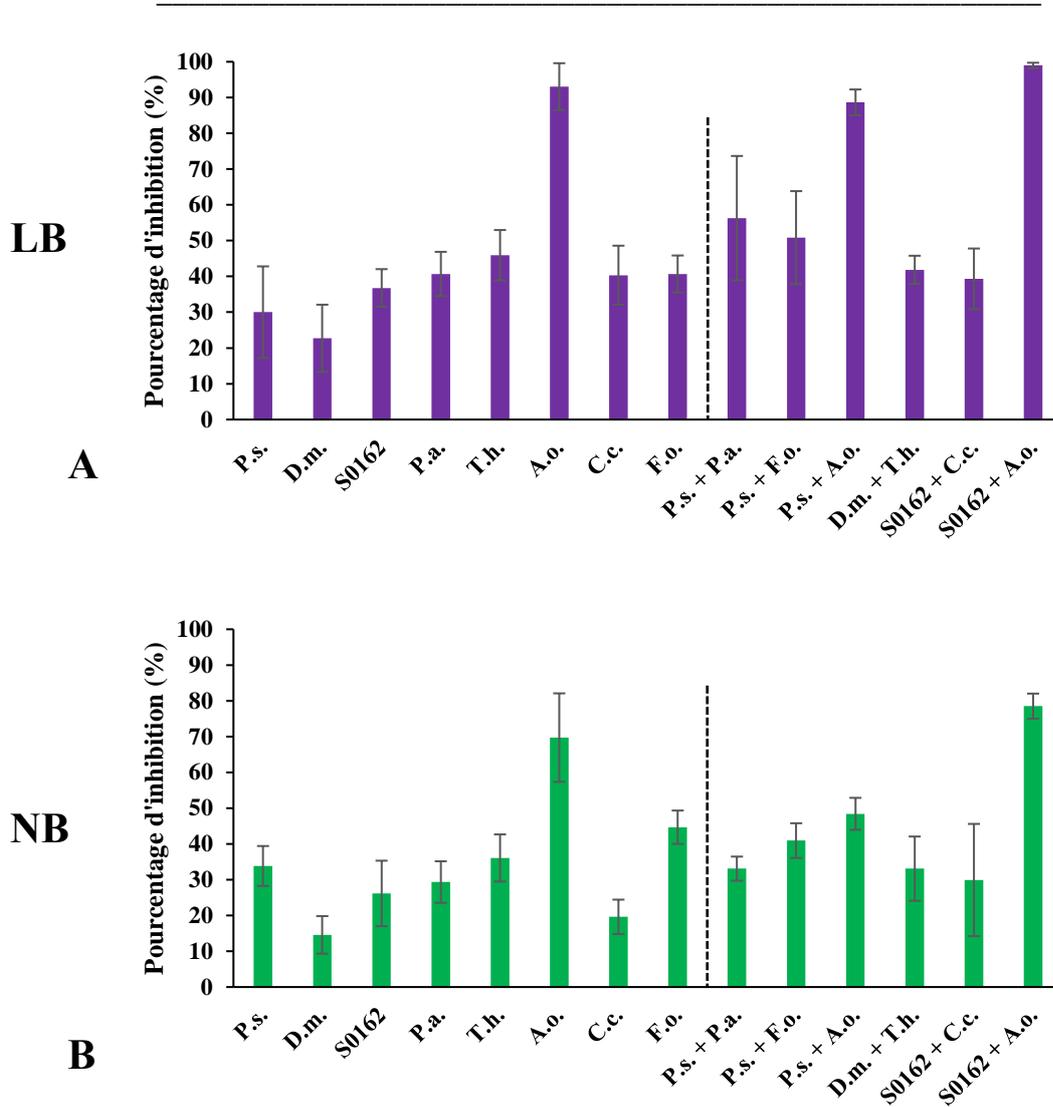


Figure 31 : Pourcentage d'inhibition obtenus à partir de matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 5 jours de croissance en présence des différents surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Pseudozyma aphidis*, *Pseudomonas syringae* + *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Dietzia* sp. + *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae* générés dans les milieux **LB** (A) et **NB** (B) et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu.

Ces pourcentages d'inhibition confirment ce qui a été observé précédemment : les activités antifongiques des surnageants générés dans le milieu NB sont inférieures à celles en milieu LB, avec un maximum à 99 % d'inhibition pour *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* en milieu LB et 78,5

% pour le même couple en milieu NB. En milieu liquide, aucune activité de co-culture n'est supérieure à celle des deux partenaires seuls. Cependant, le couple *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* présente toujours la tendance d'une activité supérieure à *A. oryzae* UMIP 1042.72, qui montre la deuxième meilleure activité et la meilleure activité parmi les monocultures (milieu LB : 93 %, milieu NB : 69,7 %).

3.4.2 Deuxième phase de tests

Des tests supplémentaires d'activité antifongique contre *F. oxysporum* BRCR7 en milieu liquide ont été réalisés cette fois sur une période de deux et cinq jours, utilisant les surnageants des co-cultures montrant l'activité antifongique la plus intense sur boîte (*Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, *P. syringae* + *A. oryzae*), générés en milieu LB.

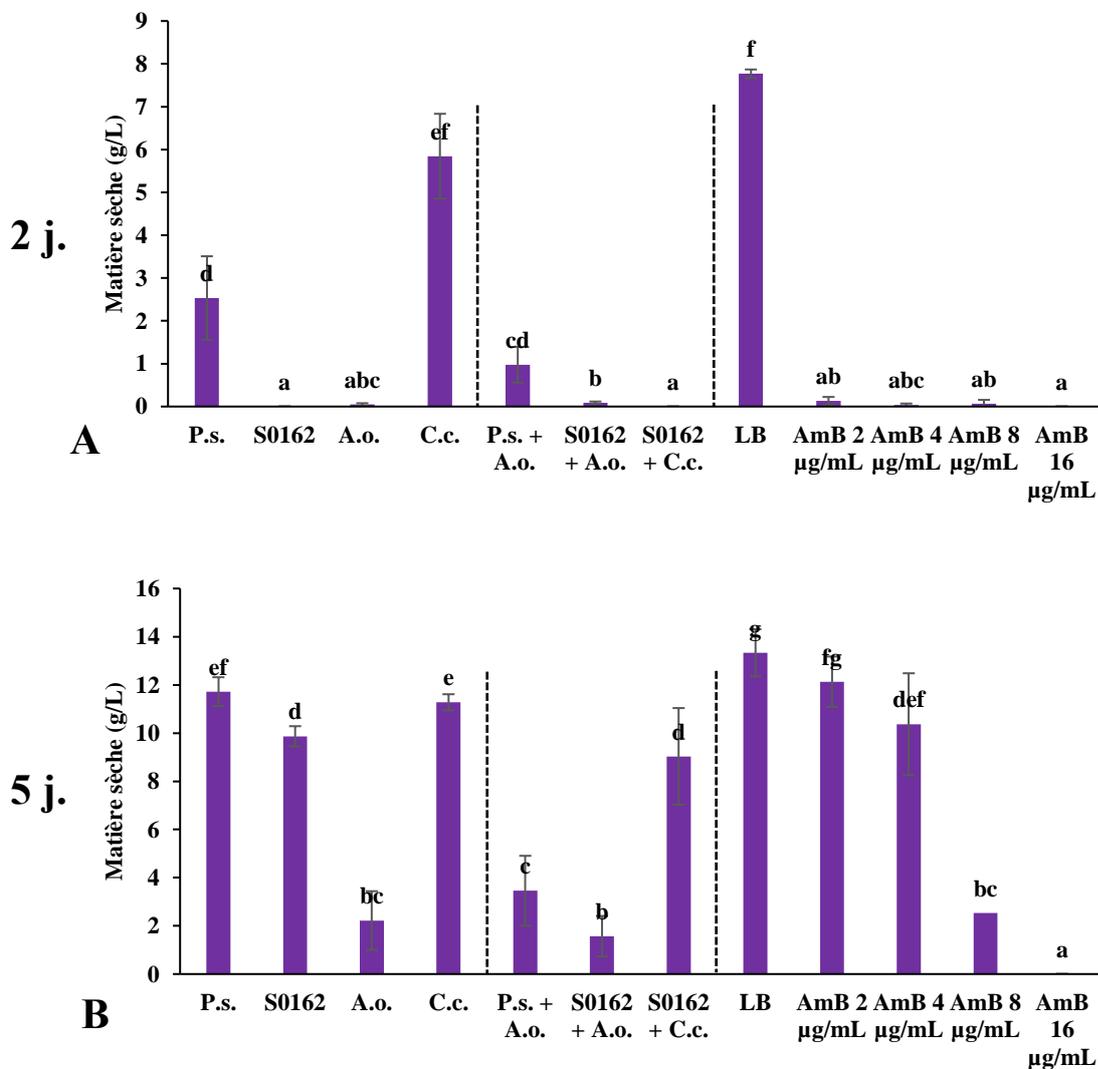


Figure 32 : Matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 2 jours (A) et 5 jours (B) de croissance à l'issue de tests d'activité antifongique en milieu liquide à partir

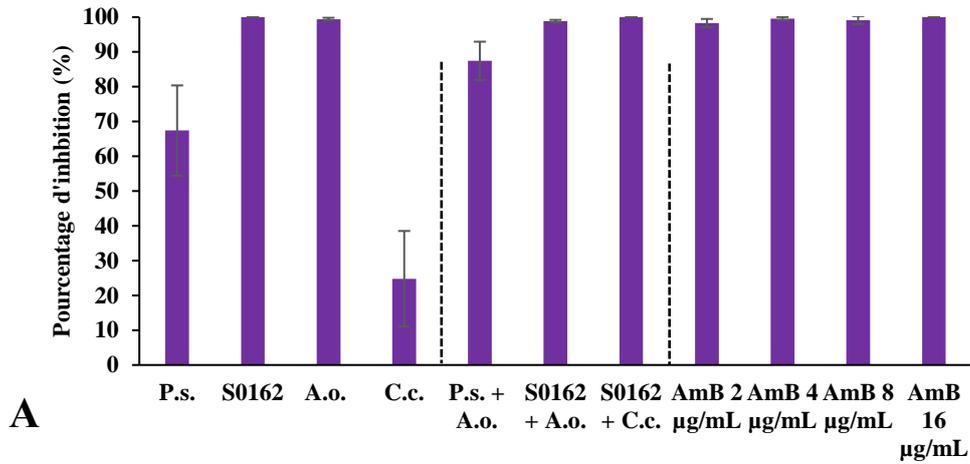
de surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, et *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) générés dans le milieu LB et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu PDB. Des lettres différentes (a-g) dans la même rangée indiquent des différences statistiques ($P < 0,05$, test de Student). L'amphotéricine B a été utilisé comme témoin positif aux concentrations 2, 4, 8 et 16 $\mu\text{g/mL}$, et le milieu LB resuspendu dans du PDB comme témoin de croissance.

Grâce aux tests réalisés à deux stades de croissance différents, il est possible d'observer une activité différentielle dans le temps (Figure 32). Au bout de deux jours, la plupart des surnageants ont une activité nette contre *F. oxysporum* : *A. oryzae* UMIP 1042.72 (0,05 g/L) et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (0,09 g/L), qui étaient ceux présentant l'activité la plus intense que ce soit sur boîte ou en milieu liquide, mais aussi *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* pour lesquels aucune croissance du champignon n'est observée. Les activités les plus faibles apparaissent pour *P. syringae* DSM 10604 (2,53 g/L) et *C. cladosporioides* PNF6 (5,84 g/L) ; cependant, pour tous les surnageants, un développement de *F. oxysporum* inférieur à celui dans le LB seul est observé. Les quatre concentrations d'amphotéricine présentent aussi une inhibition de croissance similaire à celle observée pour les meilleures activités de surnageants.

Cependant, après cinq jours de croissance, l'inhibition de *F. oxysporum* n'est significative que pour *A. oryzae* UMIP 1042.72 (2,22 g/L), *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (1,57 g/L) et *P. syringae* + *A. oryzae* (3,46 g/L). Pour *Streptomyces* sp. S0162 (9,87 g/L) et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* (9,03 g/L), *F. oxysporum* a quasiment rattrapé son retard de croissance. De même, pour les témoins amphotéricine B, seules les concentrations 8 (2,53 g/L) et 16 $\mu\text{g/L}$ (0 g/L) montrent un effet d'inhibition significatif.

Les pourcentages d'inhibition de croissance ont également été déterminés à partir des données obtenues sur le développement (matière sèche) de *F. oxysporum*.

2 j.



5 j.

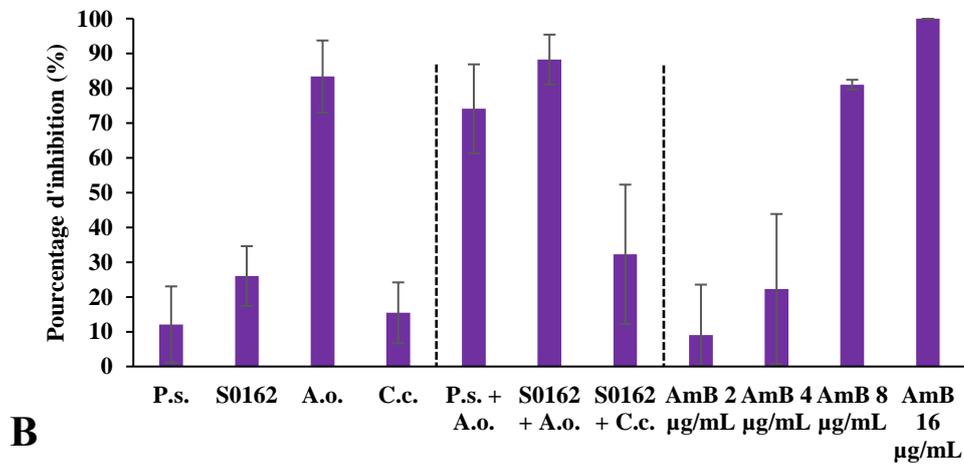


Figure 33 : Pourcentage d’inhibition obtenus à partir de matières sèches (g/L) de *Fusarium oxysporum* BRCR7 obtenues après 2 jours (A) et 5 jours (B) de croissance en présence des différents surnageants de monocultures (les bactéries *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Streptomyces* sp. S0162 et les champignons *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6) et co-cultures (*Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*, et *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides*) générés dans le milieu LB et lyophilisés puis resuspendus dans un milieu PDB. L’amphotéricine B a été utilisé comme témoin positif aux concentrations 2, 4, 8 et 16 µg/mL, et le milieu LB resuspendu dans du PDB comme témoin de croissance.

En se focalisant sur les pourcentages d’inhibition de croissance après deux jours (Figure 33A), il est notable qu’ils sont pour la plupart supérieurs à 98 % (pour *Streptomyces* sp. S0162 – 100 %, *A. oryzae* UMIP 1042.72 – 99,4 %, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* – 98,8 %, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* – 100 % et les témoins amphotéricine B).

seul n'inhibe la croissance de *F. oxysporum* qu'à hauteur de 24,7 % et *P. syringae* DSM 10604 à 67,4 % par rapport à 87,4 % pour *P. syringae* + *A. oryzae*. Après cinq jours (Figure 33B), les pourcentages d'inhibitions sont tous réduits. Cependant, ils restent élevés pour *A. oryzae* UMIP 1042.72 (83,4 %) et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (88,2 %), ainsi que *P. syringae* + *A. oryzae* (74,1 %). L'inhibition par *Streptomyces* sp. S0162 (26 %) devient similaire à celle par *C. cladosporioides* PNF6 (15,4 %) et la co-culture inhibe plus *F. oxysporum* (32,3 %) mais pas de façon significative par rapport aux monocultures.

Globalement, aucune co-culture ne montre une activité significativement supérieure aux deux monocultures constitutives. Cependant, après 5 jours, l'inhibition par *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* montre une tendance à être supérieure à celle par *A. oryzae* seul. Les activités observées confirment cependant l'intérêt des différentes co-cultures sélectionnées, qui continuent à montrer une activité contre *F. oxysporum*, similaire voire supérieure à l'amphotéricine B à des concentrations élevées (2, 4 ou 8 µg/mL).

3.5 Cytométrie en flux

Des tests d'activité antifongiques utilisant des surnageants d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* générés en milieu LB et lyophilisés ont également été réalisés avec *S. cerevisiae* comme cible. La nature non filamenteuse et non sporulante de ce microorganisme a permis de réaliser un suivi sur 48 h de l'activité des surnageants.

En même temps que les cultures, un suivi de DO₆₀₀ a permis de mettre en relation les résultats obtenus en cytométrie en flux, notamment le décompte d'événements et les observations de densité optique.

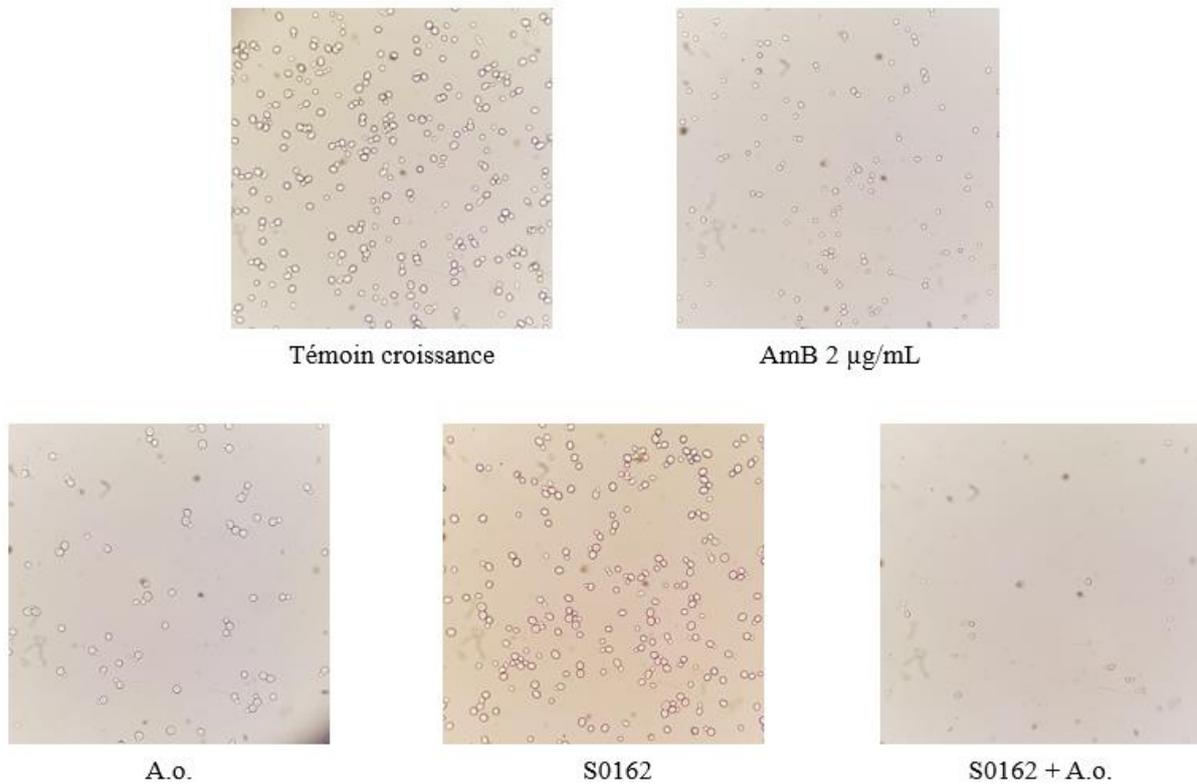


Figure 34 : Prises de vues des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* observées au microscope (grossissement x 400) après 48 h de croissance en présence d'amphotéricine B à 2 µg/mL et des surnageants de culture d'*Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*. Un témoin de croissance, sans surnageant ou molécule antifongique, est également présenté.

La figure 34 montre le développement de *S. cerevisiae* pour chaque condition du test. Il est ainsi possible de distinguer plusieurs cas de figure : en présence du surnageant de *Streptomyces* sp en monoculture, *S. cerevisiae* croît de façon identique au témoin : $DO_{600} = 22$ (témoin : 21,3). L'amphotéricine B inhibe clairement la croissance de *S. cerevisiae* avec une densité des cellules beaucoup plus faible ; cependant, comme pour ce qui a été observé contre *F. oxysporum*, cette inhibition est transitoire et après 48 h est moins marquée qu'après 24 h ($DO_{600} = 1,57$ après 24 h et $DO_{600} = 10$ après 48 h). Pour *A. oryzae* UMIP 1042.72, le même développement moins important de *S. cerevisiae* est observé ($DO_{600} = 3,63$). Pour tous ces échantillons, l'aspect de *S. cerevisiae*, bien que sa densité varie, reste le même, et l'on peut même observer des cellules en bourgeonnement. Dans le cas de *S. cerevisiae* mis en présence du surnageant de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, la densité est non seulement amoindrie ($DO_{600} = 2,05$), mais l'intégrité des cellules est également atteinte, avec une taille beaucoup plus petite. Ces observations peuvent

être faites avec l'amphotéricine B (taille plus petite des cellules notamment) et *A. oryzae* mais pas de façon aussi appuyée qu'avec la co-culture.

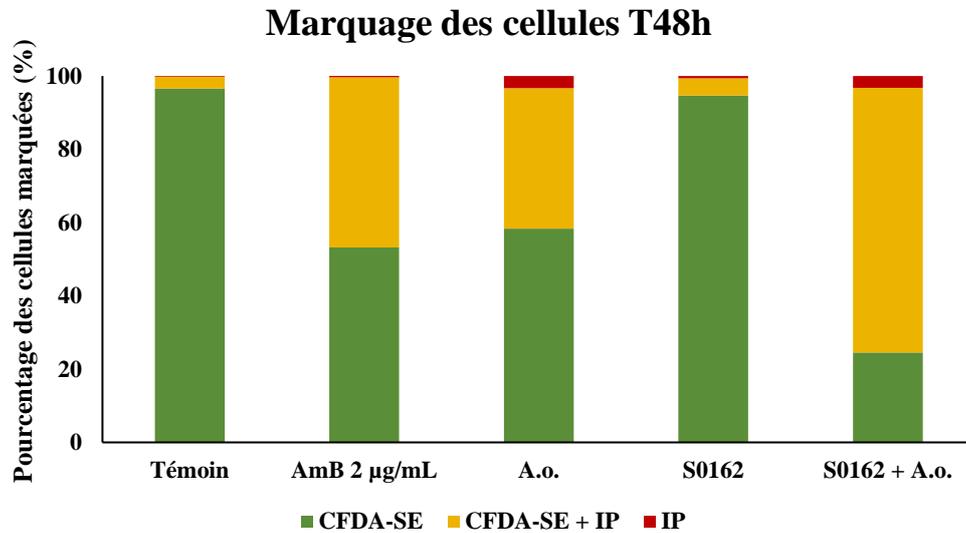


Figure 35 : Résultats de cytométrie en flux après 24 et 48 h, avec un échantillon témoin de croissance, un témoin Amphotéricine B (2 µg/mL), et trois échantillons contenant les surnageants lyophilisés d'*Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, de *Streptomyces* sp. S0162 et de la co-culture *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae*.

La cytométrie en flux a permis un suivi de l'état des cellules de *S. cerevisiae* plus en détail (Figure 35). Les résultats présentés sont ceux après avoir retiré les cellules non marquées par le CFDA-SE ou l'IP, qui représentent de 5,1 à 26,6 % du total pour chaque échantillon. Le marquage observé confirme ce qui a été observé au microscope : le témoin croissance a une majorité de cellules marquées au CFDA-SE (96,6 %) – des cellules vivantes et actives métaboliquement ; le même constat est fait pour *S. cerevisiae* en présence du surnageant *Streptomyces* sp. S0162 (94,7 % de cellules marquées au CFDA-SE). Pour les deux échantillons, une petite portion de cellules sont marquées au CFDA-SE et à l'IP, et sont donc fragilisées (3,2 % pour le témoin et 4,7 % avec *Streptomyces* sp. S0162). Avec l'amphotéricine B, 53,2 % de cellules sont uniquement marquées au CFDA-SE, et 46,5 % de cellules doublement marquées. Le même type de profil est constaté avec *A. oryzae* UMIP 1042.72, pour lequel 58,3 % des cellules sont vivantes et 38,4 % endommagées. Cependant, le nombre de cellules uniquement marquées à l'IP (endommagées et dont le métabolisme n'est plus actif, donc mortes) atteint 3,3 %, largement supérieur aux valeurs notées pour les autres échantillons (témoin : 0,23 %, amphotéricine B : 0,34 % et *Streptomyces* sp. S0162 : 0,58 %). Enfin, en présence du surnageant issu de la co-culture de *Streptomyces* sp. et *A. oryzae*, *S. cerevisiae*

montre le plus faible taux de cellules vivantes (24,5 %) et une majorité de cellules endommagées (72,3 %). Le pourcentage des cellules mortes atteint une valeur similaire à ce qui est observé pour *A. oryzae*, 3,2 %. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé au microscope (Figure 34), avec un aspect endommagé des cellules très visible par rapport aux autres échantillons.

On peut également noter que le pourcentage de cellules non marquées (qui peuvent correspondre notamment à des débris cellulaires) est le plus élevé pour l'échantillon *Streptomyces* sp. S0162 (26,6 % du total) et le plus bas pour le témoin (5,1 %) avec entre les deux *A. oryzae* UMIP 1042.72 (15,4 %), l'amphotéricine B (10,4 %) et la co-culture (6,7 %).

Les tests réalisés en cytométrie en flux ont permis de confirmer une activité contre *S. cerevisiae* des surnageants d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 et de *Streptomyces* sp. S0162 ainsi que de leur co-culture, qui est similaire voire meilleure que l'amphotéricine B à 2 µg/mL. En outre, le surnageant de co-culture semble avoir une activité qui cible plus particulièrement la paroi des cellules de *S. cerevisiae* (plus qu'*A. oryzae* seul ou que l'amphotéricine B).

4. Discussion

Dans cette étude, il était nécessaire de réaliser plusieurs co-cultures simultanément tout en surveillant leur développement et en le comparant aux monocultures correspondantes. Les microbioréacteurs tels que le BioLector (m2p lab) ont déjà été utilisés pour cultiver à la fois des bactéries (Gupta et al. 2017) et des champignons en monocultures (Raulo et al. 2021). Il est possible de suivre la croissance des microorganismes et de réaliser un nombre important de cultures (48 en BioLector) avec différentes conditions en parallèle. Dans les investigations rapportées, le BioLector a été utilisé pour réaliser de multiples mono- et co-cultures en parallèle, et pour générer des surnageants dont les activités antifongiques ont été criblées.

Le suivi de la croissance des microorganismes impliqués dans les monocultures et les co-cultures a été possible grâce à des observations visuelles associées et à une supervision en temps réel de la biomasse à travers le microbioréacteur (Jansen et al. 2021). Le basidiomycète *P. aphidis*, a montré une croissance de type levure et s'est très rarement développée sous forme de mycélium dans les conditions choisies, ce qui est conforme à la littérature (Gafni et al. 2015). Cela a gêné l'observation de la co-culture à la fois visuellement et par le suivi de l'évolution de la biomasse, car la différence entre le développement planctonique de *P. aphidis* DSM 1247 et celui du partenaire bactérien n'était pas distinguable (Figure 19). Cependant, pour de nombreux couples impliquant *P. aphidis* DSM 1247, comme *P. syringae* + *P. aphidis*, contre *F. oxysporum* BRCR7, la co-culture a montré une activité accrue par rapport aux monocultures dans les tests d'activité antifongique sur gélose, ce qui prouve le développement des deux partenaires bien qu'il ne soit pas observable dans les conditions choisies (Figure 21).

Le test de diffusion en gélose est largement utilisé pour caractériser l'activité antimicrobienne (Vizcaino et al. 2005), et en particulier l'activité antifongique (Paul et al. 2007). Il est bien adapté au criblage de l'activité antifongique globale présente dans les surnageants de mono ou co-culture, en évitant de considérer séparément chaque métabolite produit. En outre, ce type de tests permet d'examiner les activités antifongiques additives et synergiques présentes dans les métabolites secondaires sécrétés. L'utilisation de la méthode de diffusion en gélose pose cependant encore quelques limites, car ce qui est observé en plus de l'efficacité de l'inhibition est également lié à la diffusion des molécules produites dans la gélose, influencée par le poids moléculaire des molécules ainsi que par leur hydrophobie (Murray 2015).

En parallèle des tests sur milieu gélosé, des tests en milieu liquide ont été réalisés. Ceux-ci apportent des informations supplémentaires quant au comportement des molécules présentes

dans les surnageants de culture. En effet, dans un milieu liquide agité, la diffusion des molécules actives n'est plus un facteur limitant, le milieu étant homogénéisé. Aussi, certaines activités peuvent donc apparaître plus importantes que sur boîte. C'est le cas par exemple pour le couple *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* qui présente une inhibition quasi-totale de la croissance de *F. oxysporum* BR7 et *S. cerevisiae* en milieu liquide après 5 jours ou 48 h respectivement (Figures 31 et 34) mais aussi pour l'amphotéricine B, qui, bien qu'étant un composé antifongique, diffuse très mal dans l'agar du fait de sa faible solubilité dans l'eau (Howarth et al. 1975). Aussi, utilisés en complément de tests en milieu gélosé, les tests en milieu liquide permettent d'affiner l'analyse.

Les tests en milieu liquide ont en outre mis en évidence l'activité limitée dans le temps de *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, qui après 48 h montrent une inhibition totale de *F. oxysporum* BR7 qui est perdue après 5 jours de test, tandis que l'activité d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* ou *P. syringae* + *A. oryzae* est plus stable sur cette période de temps (Figure 33). En outre, le développement de *F. oxysporum* BR7 à 5 jours, après les deux jours d'inhibition totale par *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, s'est montré similaire à celui du champignon seul au bout de trois jours (Figure 18). Ce type d'activité transitoire a déjà été décrit dans la littérature : d'abord une absence de développement de la cible est tout d'abord observé puis la colonisation des zones d'inhibition se produit (Csutak et al. 2013). Cette perte d'inhibition peut être due à la dégradation des molécules produites, par exemple par le microorganisme ciblé (Sugawara et al. 2019). Globalement, les tests en milieu liquide ont permis d'affiner les conclusions faites en milieu gélosé, et de déterminer de façon plus précise des activités transitoires qui n'étaient pas observables sur milieu solide. Ils ont aussi confirmé l'activité très intense et durable de la co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et de la culture d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 seul.

Le développement des microorganismes en co-culture peut ressembler au développement observé pour les monocultures (Figure 24 et tableau 12). Par exemple, la co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* présente un développement majoritaire du champignon, et un développement beaucoup plus faible de la bactérie. En outre, la matière sèche de la co-culture était toujours inférieure à celle du champignon seul. Aussi, *A. oryzae* UMIP 1042.72 pourrait avoir produit des métabolites et des enzymes antagonistes à *Streptomyces* sp. S0162, ce qui a diminué fortement sa croissance et a par exemple inhibé la production de pigments que l'on peut voir en monoculture (Figure 24) mais *Streptomyces* sp. S0162 s'étant tout de même développé, il a peut-être également pu inhiber le développement d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, ce

qui expliquerait la quantité de matière sèche inférieure à celle d'*A. oryzae*. Au contraire, dans le cas de *Dietzia* sp. DM01 et *T. harzianum* Rifai MUCL 29707 en milieu LB où les deux partenaires présentent un développement visible et une masse sèche légèrement supérieure à *T. harzianum* Rifai MUCL 29707 (Figure 28A), un développement normal des deux microorganismes peut être supposé dans le cadre d'une interaction neutre ou même positive. Cela peut se confirmer par l'absence d'activité antifongique sur boîte de cette co-culture.

Après le criblage primaire, six couples ont été sélectionnés et leurs co-cultures réalisées dans des flacons. Les surnageants obtenus ont été concentrés et leur activité antifongique testée (Figures 25 et 26). Comme dans cette étude, un comportement dose-réponse a été précédemment examiné dans la littérature (Cantrell et al. 2005), où l'on peut voir que la modification de la dose n'équivaut pas nécessairement à une modification de l'activité. Ceci est en accord avec les résultats obtenus, surtout lorsque ceux du criblage primaire et secondaire sont comparés. En effet, en règle générale, la concentration inférieure de surnageant utilisée (x 5) (Figures 25 et 26) n'a pas présenté de diamètres d'inhibition significativement différents par rapport à l'échantillon non concentré (Figure 21). De plus, en comparant des monocultures très actives dans le milieu LB comme *A. oryzae* UMIP 1042.72 à des co-cultures comme *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, la co-culture est restée active même à des concentrations plus faibles (x 5) par rapport à la monoculture dans les mêmes conditions (Figure 25). Cela laisse supposer une production différentielle de métabolites par la co-culture par rapport à la monoculture, car il y a une nette différence dans la diffusion des surnageants dans les mêmes conditions de gélose. Les molécules peuvent également passer de l'inhibition de la croissance à son renforcement en fonction de la concentration ou de la cible (Fokialakis et al. 2006). Cela peut expliquer le comportement très différent du surnageant d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 dans les deux criblages. De plus, la concentration du surnageant ayant été effectuée par lyophilisation, le profil des métabolites du surnageant peut avoir été modifié par rapport aux échantillons non concentrés (Palacios et al. 2014). Cela peut ajouter aux différences entre les échantillons non concentrés et les échantillons concentrés.

Les conditions de culture utilisées peuvent également avoir un effet sur l'activité observée (Miao et al. 2006) : c'est notamment le cas pour *A. oryzae* UMIP 1042.72 qui n'a montré aucune activité lorsqu'il était cultivé seul dans le BioLector (Figure 21), mais qui a montré beaucoup plus d'activité dans des flacons, notamment contre *F. oxysporum* BR7 (Figures 25 et 33), dans des volumes plus importants. C'est une voie possible pour améliorer l'activité des monocultures et des co-cultures.

En outre, il a été observé que les activités des mêmes microorganismes n'étaient pas les mêmes selon le milieu utilisé, bien que les milieux NB et LB soient tous les deux riches et aient des compositions relativement similaires. De plus, le développement de *F. oxysporum* BRCR7 a été très différent dans un milieu PDB et un milieu LB lyophilisé puis resuspendu dans du PDB : la masse fongique qui s'est développée est supérieure en LB et il y a une absence de sécrétion de pigments rose et rouge caractéristiques de la croissance de *F. oxysporum* BRCR7 en PDB solide ou liquide. Il a été montré que la source des nutriments pour les microorganismes influence le type de métabolites produits ainsi que leur quantité ; c'est le cas par exemple de la production de lipopeptides par *Bacillus amyloliquefaciens* dont la nature et la proportion change selon la source de carbone (Singh et al. 2014). Le champignon marin *Arthrinium saccharicola* cultivé dans différentes conditions de milieu a pu montrer une activité biologique plus élevée dans un milieu riche en carbone et un développement plus rapide dans un milieu riche en azote (Miao et al. 2006).

Des co-cultures impliquant les genres *Aspergillus* et *Streptomyces* ont été décrites dans plusieurs études : la production d'alcaloïdes par *A. fumigatus* lorsqu'il est co-cultivé avec *Streptomyces peucetius* en milieu liquide a été décrite (Zuck et al. 2011). De même, il a été montré que la co-culture d'*A. flavipes* et de *Streptomyces* sp. isolés d'un habitat marin induisait la production de cytochalasans par *A. flavipes* (Yu et al. 2016). Des co-cultures impliquant les genres *Pseudomonas* et *Aspergillus* ont également été étudiées. Par exemple, une co-culture entre *P. aeruginosa* et *A. fumigatus* a entraîné l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* et la réduction de la formation de biofilms par la production d'un métabolite secondaire, la gliotoxine, par *A. fumigatus* (Reece et al. 2018). Cependant, ni *P. syringae* + *A. oryzae* ni *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* n'ont été décrits ensemble en co-culture. Par ailleurs, il est intéressant de noter que si elles ont été étudiées séparément (Wang et al. 2013) pour leur activité antifongique ou dans différentes co-cultures (Zuck et al. 2011; Srivastava et al. 2018), *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* n'ont pas encore été décrites ensemble pour leur activité antifongique en co-culture. Cela fait des candidats sélectionnés pour la co-culture des choix très convaincants.

Lors du criblage primaire, les co-cultures de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *P. syringae* + *A. oryzae* ont montré, dans les surnageants non concentrés, une activité beaucoup plus élevée que leurs co-cultures respectives (Figure 21). Cela peut indiquer une synergie et/ou une induction génique du ou des gènes codant pour la ou les molécules ayant des effets antifongiques. En particulier, dans le criblage primaire et secondaire, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*

montre une activité synergique contre *F. oxysporum* BRCR7 tandis que *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *P. syringae* + *A. oryzae* semblent posséder une activité antifongique additive, en particulier dans les concentrations plus élevées, par rapport à leurs monocultures respectives (Figure 25). Ainsi, la stratégie de co-culture bactérie-champignon semble particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *F. oxysporum* *in vitro*.

Bien que la nature des métabolites produits par les différentes mono- et co-cultures n'a pas été déterminée, il est possible de supposer au moins un des modes d'action existants dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*. En effet, l'étude de son activité et de celle de ses monocultures constitutives via la cytométrie en flux (Figure 35) aide à l'interprétation. La cytométrie en flux telle qu'elle est utilisée dans ce chapitre, permet un suivi des cellules vivantes, via la détection d'activité estérase avec le marqueur CFDA-SE qui pénètre dans les cellules via diffusion et sert de substrat aux estérases intracellulaires. Clivé par les estérases intracellulaire, il émet une fluorescence qui est détectée par le cytomètre (Díaz et al. 2010; Lyons 1999). L'iodure de propidium (IP), qui est un autre marqueur fluorescent, se lie aux acides nucléiques ; il ne peut pénétrer que dans les cellules dont la membrane a été endommagée (Díaz et al. 2010). Les cellules marquées par le CFDA-SE et l'IP sont donc encore vivantes mais leur membrane a été endommagée.

D'après les résultats présentés dans la figure 35, *A. oryzae* UMIP 1042.72 et l'amphotéricine B ont tous deux montré une activité liée à une fragilisation des cellules de *S. cerevisiae*, du fait de la grande proportion de cellules doublement marquées. Un des modes d'action de l'amphotéricine B est la formation de pores dans la membrane des cellules ciblées ; ce mode d'action n'est cependant pas nécessairement la cause directe de la mort des cellules (Baginski, Czub 2009). Cela correspond à ce qui a été observé au bout de 48 h pour *S. cerevisiae* : presque la moitié des cellules sont endommagées, cependant cette fragilisation n'est pas la cause directe ou immédiate de la mort des cellules. Les mêmes observations peuvent être faites pour l'échantillon *A. oryzae* UMIP 1042.72 et celui de la co-culture, qui présente plus de 72 % de cellules endommagées. Aussi la fragilisation de la membrane de *S. cerevisiae* semble être un des modes d'action d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 et de la co-culture l'impliquant.

5. Conclusion

Vingt-cinq co-cultures sélectionnées via l'étude de la littérature (Chapitre 2, partie 2.2) ont été testées pour leur activité antifongique. Sur les vingt-cinq, treize ont montré une activité lors de l'étape de criblage primaire en microbioréacteur. Le nombre de co-cultures et de conditions de milieu testées a été réduit grâce à la recherche d'originalité des couples et à travers un second criblage d'activité sur boîte mais aussi en milieu liquide.

A l'issue de ces différents criblages, trois couples ont été retenus pour leur activité dans le milieu LB : *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. Ce sont les co-cultures qui ont montré l'activité la plus intense et régulière et qui ont également, pour deux d'entre elles, montré une activité supérieure à celle des monocultures (*Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*). Aussi, en milieu liquide, ces deux co-cultures ont montré les activités les plus intense, bien que celle de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* ne soit que transitoire, supposant une possible dégradation par la cible des métabolites antifongiques produits ; le même comportement est observé pour l'amphotéricine B, un antifongique très utilisé contre *F. oxysporum* et contre *S. cerevisiae*. Enfin, les tests effectués en cytométrie en flux pour la co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et ses monocultures constitutives montrent une activité plus intense de la co-culture contre *S. cerevisiae* en comparaison avec *A. oryzae* UMIP 1042.72 (*Streptomyces* sp. S0162 ne présentant aucune activité dans ces conditions), et permet de supposer qu'un des modes d'action de la co-culture est la fragilisation des membranes de la cible, par la formation de pores. Les résultats obtenus dans ce chapitre valident bien des activités antifongiques ; en outre, la variabilité induite par le temps de culture et le temps d'exposition aux surnageants dans les tests antifongiques est très importante. Cet aspect n'est pas maîtrisé et n'a pas fait l'objet d'une optimisation, ce qui explique les résultats variables observés tout au long du chapitre.

Ce chapitre a pu montrer que la stratégie de criblage en deux phases combinant des microfermentations lors du criblage primaire suivie de la culture en fioles et de la concentration des surnageants peut être une approche efficace afin de trouver de nouvelles activités antifongiques chez des co-cultures.

CHAPITRE 4 : ANALYSE DES SURNAGEANTS DE CULTURE

1. Introduction

Les deux criblages réalisés afin de déterminer l'activité antifongique des co-cultures choisies ont permis de sélectionner trois couples présentant un potentiel antifongique significatif : *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. La diversité des tests entrepris a permis de commencer à supposer des activités différentielles des couples et d'éventuels modes d'action.

Cependant, la production de molécules par les mono- et les co-cultures n'a pas encore été élucidée. Or, un des objectifs de la thèse est de caractériser la production de molécules et particulièrement de composés antifongiques en co-culture, celle-ci conduisant éventuellement à l'explication d'une activité différentielle observée dans le chapitre précédent.

Dans ce chapitre, l'intérêt s'est porté sur le potentiel de production des différents microorganismes considérés, par l'étude de leurs clusters de gènes codant pour des métabolites secondaires. Puis, les métabolites effectivement produits et sécrétés en mono- et en co-culture ont été étudiés via une analyse LC-MS Q-TOF, et confrontés à des bases de données de molécules pour une possible identification. Enfin, une analyse protéomique et peptidomique d'un couple en particulier, *P. syringae* + *A. oryzae* (ainsi que les monocultures constitutives) a été réalisée, afin de tenter de comprendre et d'expliquer le comportement des deux souches en co-culture.

2. Matériels et méthodes

2.1 Caractéristiques du génome

Pour l'extraction de l'ADN, trois kits d'isolement d'ADN génomique ont été utilisés. Pour l'extraction de l'ADN de *Streptomyces* sp. S0162 et *P. syringae* DSM 10604, le kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) et pour l'extraction de l'ADN de *C. cladosporioides* PNF6, le kit DNeasy® Powersoil® (Qiagen, Allemagne) ont été utilisés compte tenu des caractéristiques pariétales. L'ADN extrait pour chacune des souches a été quantifié par un spectrophotomètre ND-1000 NanoDrop. Il a été séquencé par Novogene (Novogene Co., Ltd. Grande Bretagne).

Le traitement des données après le séquençage a été réalisé à l'URCA par Ludovic Besaury. Les bibliothèques de séquençage shotgun de l'ADN du génome entier ont été préparées à l'aide du kit Nextera XT (Illumina), et un séquençage paired-end de 2×150 pb a été réalisé à l'aide d'un instrument NextSeq500 d'Illumina. Les données de séquençage ont été filtrées en fonction de la qualité des reads obtenus en utilisant le logiciel FastQC (Andrews 2010), découpées avec PrinseqLite (Schmieder, Edwards 2011) et assemblées *de novo* avec SPAdes (Bankevich et al. 2012). La qualité et la teneur en % en GC des génomes a été déterminée avec le logiciel Quast (Gurevich et al. 2013). Les séquences génomiques de *Streptomyces* sp. S0162, *P. syringae* DSM 10604 et *C. cladosporioides* PNF6 ont été soumises au serveur antiSMASH 6.0 (Blin et al. 2021) afin d'identifier les gènes codant potentiellement pour des métabolites secondaires bioactifs.

2.2 Analyses en LC-MS Q-TOF

2.2.1 Préparation et analyse des échantillons

1 mL de surnageants de culture lyophilisés (*P. syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162, *C. cladosporioides* PNF6, *A. oryzae* UMIP 1042.72 et *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*) et de milieu LB stérile (témoin) ont été resuspendus dans 50 µL d'eau MilliQ et 50 µL de SSA à 10 % (m/v), ainsi que 100 µL d'éthanol, les concentrant ainsi 5 fois. Ils ont été laissés 1 heure à 4 °C afin de faire précipiter les protéines, puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Pour chaque échantillon traité, le surnageant a été récupéré et filtré sur un filtre seringue en RC à 0,2 µm. Les échantillons ainsi préparés ont ensuite été passés en LC-MS Q-TOF.

Les analyses LC-MS Q-TOF ont été réalisées à l'URD ABI à Pomacle par Abdouramane Dosso et Fanny Brunissen. Une chaîne UHPLC Agilent Technologies 1290 (Santa Clara, CA, USA)

couplée à un détecteur à barrette de diodes (PDA) et à un spectromètre de masse 6545 QToF (Wilmington, Etats-Unis) a été utilisée.

Les chromatogrammes ont été enregistrés et traités avec le logiciel Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition version B.08.00. Les composés ont été séparés par une colonne Zorbax Eclipse plus C18 (1,8 μm , 50 \times 2.1 mm ; Agilent Technologies, Etats-Unis). L'élution a été réalisée à l'aide d'une phase mobile composée d'eau ultrapure avec 0,1 % d'acide formique (solvant A), et d'acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique (solvant B) selon le gradient suivant : 5 % B de 0 à 0,5 min, 10 % B de 0,5 à 4 min, plateau de 10 % B de 4 à 9 min, 25 % B de 9 à 13 min, 30 % B de 13 à 14 min, plateau pendant 1 min de 30 % B, ensuite montée à 100 % B de 15 à 17 min avec un plateau de 2 min, retour aux conditions initiales de 19 à 20 min. La colonne était chauffée à 40 °C avec un débit de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un volume d'injection de 1 μL . La détection en UV a été réalisée aux longueurs d'onde suivantes : 320, 280, 254 et 210 nm.

L'acquisition des données a été faite en MS en mode ESI positive. Les paramètres du détecteur de masse sont les suivants : température du gaz 325 °C, débit du gaz 8 L/min, pression du nébuliseur 35 psi, tension du fragmenteur 120 V et le Vcap 1500 V. Comme gaz de désolvatation et de nébulisation, l'azote N_2 (> 99,5 %) a été utilisé. Les mesures de masses précises (< 5 ppm) ont été réalisées en utilisant l'ion à m/z 922,00979 $[\text{M}+\text{H}]^+$ comme lock mass (ion de référence).

2.2.2 Traitement des données

Les données obtenues à l'issue de ces analyses ont été traitées à l'aide du logiciel Agilent MassHunter Qualitative Workflows version B.08.00. Les 50 pics les plus intenses ont été retenus pour chaque échantillon et une identification des pics a été réalisée à partir de l'algorithme Compound Discovery. En se basant sur la distribution de l'amas isotopique de chaque pic et la parité de l'azote, il a été attribué à chaque pic une formule brute. Des essais de correspondance de chaque formule brute putative ont été effectués à partir des bases de données enrichies par les résultats des analyses réalisées à l'URCA. Lorsqu'aucune correspondance avec les bases de données natives de l'URD ABI n'a été trouvée, des recherches sur la base de données ChemSpider ont été conduites et les 10 premières formules IUPAC trouvées (classement par nombre de références existant pour une molécule donnée) répertoriées. A partir de celles-ci, les familles de molécules ou groupements ressortant de façon majoritaire parmi les 10 premiers résultats ont été compilés. Les formules brutes identifiées dans les échantillons qui ont été retrouvées dans le milieu LB ont été retirées pour l'interprétation des résultats.

2.3 Analyses protéomiques et peptidomiques

Ces analyses ont été réalisées à l'UMRt BioEcoAgro à Lille par Barbara Deracinois et Christophe Flahaut. Les expériences NanoLC-Orbitrap ont été réalisées par CLIC-Imaging, le centre de spectrométrie de masse du laboratoire PRISM (INSERM U1192) de l'Université de Lille. Le CLIC-Imaging a été financé par le SIRIC ONCOLille (subvention INCa-DGOS-Inserm 6041), la Région Nord-Pas de Calais (France) et l'Université de Lille.

Les échantillons utilisés ont été préparés de la même façon que ceux envoyés pour l'analyse des métabolites : 1 mL de surnageant de culture de *P. syringae* DSM 10604, *A. oryzae* UMIP 1042.72 et *P. syringae* + *A. oryzae* ainsi que du milieu LB stérile incubé dans les mêmes conditions que les cultures ont été lyophilisés pendant 24 heures.

2.3.1 Séparation de la partie protéique et de la partie peptidique par chromatographie d'exclusion stérique

Un millilitre de chaque surnageant a été lyophilisé puis repris dans 500 µl d'eau ultra pure avant dilution au demi dans le solvant chromatographique constitué de 30 % ACN et 0.1 % TFA et enfin centrifugé 5 min à 10 000 x g. La partie protéique a été séparée de la partie peptidique par chromatographie d'exclusion stérique après injection de 500 µl des surnageants dilués sur une colonne Superdex® 30 Increase 10/300 GL (plage de fractionnement de 100 à 7 000 Da, Cytiva) sur un système chromatographique ÄKTA pure 25M (Cytiva). L'élution des protéines/peptides a été réalisée à un débit de 0,5 mL.min⁻¹ en mode isocratique et suivie à 214 nm pendant 60 min. Deux fractions ont été récoltées : la fraction protéique et la fraction peptidique correspondant respectivement aux volumes d'élution allant de 7 à 14 min et de 14 à 26 min.

Après fractionnement, les fractions récoltées ont été séchées par évaporation centrifuge (miVac, Gene Vac, Ipswich, Royaume-Uni) pendant 3 h à 45 °C.

2.3.2 Préparation de la partie protéique avant analyse LC-MS/MS

Les fractions protéiques ont été dissoutes dans du bicarbonate d'ammonium à 25 mM, réduites (dithiothréitol 5 mM, 5 min à 80 °C), alkylées (iodoacétamide 3 mM, 20 min à 20 °C) et digérées par un mélange trypsine/Lys-C à 3 ng/µL pendant 3 h à 37 °C et à nouveau pendant 16 h à 37°C, puis centrifugées pendant 10 min à 8000 × g. Le culot a été retiré et les surnageants ont été soumis à une analyse UPLC-MS/MS.

2.3.3 Identification des protéines et des peptides par UPLC-MS/MS

Les peptides ont été dessalés avec un dispositif Millipore® ZipTips C18 (Millipore, Burlington, VT Etats-Unis). La phase C18 a été lavée avec de l'ACN à 100% puis équilibrée avec du TFA

à 0,1 %. Les peptides contenant du TFA à 0,1 % ont été liés aux embouts de pipette ZipTipC18 par 10 cycles d'aspiration / refoulement puis les embouts ont été lavés cinq fois avec 10 µL de TFA à 0,1 % pour éliminer le matériel non lié, et enfin élués deux fois avec 10 µL d'acétonitrile à 50 %. Les éluats ont été séchés et dissous dans 20 µL de solution d'acétonitrile / acide formique (2 %/0,1 %) (bain à ultrasons 5 min).

Les échantillons ont été séparés à un débit de 300 nL/min, par un système chromatographique en ligne en phase inverse (système Easy-nLC 1000 UPLC, Thermo Scientific, Waltham, USA) équipé d'une pré-colonne Proxeon (100 µm de diamètre interne x 2 cm, Thermo Scientific) et d'une colonne C18 (Acclaim PepMap 100 C18, 75 µm ID x 50 cm, Thermo Scientific). L'éluant LC a été électrosprayé directement à partir de la colonne analytique et une tension de 1,7 kV a été appliquée via la jonction liquide de la source du nanospray. Le système chromatographique était relié à un spectromètre de masse Q Exactive (Thermo Scientific) réglé pour acquérir un top 10 MS² dans un mode dépendant des données. Les balayages ont été effectués à un pouvoir de résolution de 70 000 FWHM (m/z 400), en mode positif et en utilisant une cible de contrôle automatique du gain de 5e6. L'état de charge par défaut a été fixé à 2, les états de charge non attribués et +1 ont été rejetés et l'exclusion dynamique a été activée pendant 20 s. La plage de balayage a été fixée à 300-1600 m/z. Pour le ddMS², la plage de balayage était comprise entre 200 et 2 000 m/z, un microscan a été acquis à 17 500 FWHM et une fenêtre d'isolement de 4,0 m/z a été utilisée.

Les recherches dans les bases de données ont été effectuées à l'aide des bases de données UniProtKB / Swiss-Prot et/ou UniProtKB / TrEMBL restreintes à l'organisme *Pseudomonas* (7 644 563 entrées au 1er mars 2022), à l'organisme *Aspergillus oryzae* (11 894 entrées au 18 février 2022) ou à l'organisme *Bos Taurus* (6 015 entrées au 31 janvier 2022) via le logiciel PEAKS® Studio XPro (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada). Une tolérance de masse de 35 ppm et une tolérance MS/MS de 0,2 Da étaient autorisées. Les recherches d'identité peptidique ont été effectuées en notifiant le choix de la trypsine comme enzyme et trois sites de clivage manqués autorisés ou sans notifier le choix de l'enzyme pour l'analyse respectivement protéomique ou peptidomique. L'oxydation variable de la méthionine a également été prise en compte. La pertinence des identités des protéines et des peptides a été jugée en fonction de leur score d'identification PEAKS® Studio (taux de fausse découverte (FDR) < 1 %).

Des voies fonctionnelles ont été attribuées aux protéines et peptides identifiés via l'utilisation de la plateforme KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa, Goto 2000) et MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) (Mewes et al. 2002). Chaque

protéine et peptide ont été ainsi entrés dans ces bases de données afin de déterminer leur correspondance à différents niveaux, sur la base de 10 voies fonctionnelles retenues :

- Métabolisme ;
- Synthèse protéique ;
- Energie ;
- Transport ;
- Organisation cellulaire ;
- Adressage des protéines ;
- Défense des cellules, mort cellulaire, vieillissement ;
- Croissance, division des cellules et synthèse d'ADN ;
- Transcription ;
- Inconnu/non caractérisé.

3. Résultats

3.1 Potentiel de production des différents microorganismes

La taille du génome des différentes souches séquencées est donnée dans le tableau 13.

Tableau 13 : Taille du génome et taux de GC pour chaque microorganisme considéré : *Streptomyces* sp. S0162, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Cladosporium cladosporioides* PNF6.

Souche	Taille du génome (pb)	GC mol%
<i>Streptomyces</i> sp. S0162	8 535 194	71,8
<i>P. syringae</i> DSM 10604	6 080 284	58,9
<i>C. cladosporioides</i> PNF6	34 002 207	52,4

La teneur en GC de 71,8 mol% de la souche environnementale S0162 est conforme à la teneur moyenne en GC des espèces du genre *Streptomyces* (66-78 %) (Kämpfer 2015). La même observation peut être faite pour la teneur en GC de *C. cladosporioides* PNF6, également une souche environnementale (NCBI). En outre, il est à noter que la souche *Streptomyces* sp. S0162 a été identifiée comme une nouvelle espèce par l'URCA et pourrait posséder un profil de métabolites secondaires unique étant donné l'évolution spécifique qui lui est liée. Cependant, sa caractérisation ne fera pas l'objet d'une étude ici.

L'analyse *in silico* des métabolites secondaires par antiSMASH a prédit la présence de 49 clusters de gènes biosynthétiques pour *Streptomyces* sp. S0162, 22 pour *P. syringae* DSM 10604 et 27 pour *C. cladosporioides* PNF6 (Annexe B, tableaux B-1 à B-3).

Pour *Streptomyces* sp. S0162 (Annexe B, tableau B-1), les types de métabolites secondaires les plus prédits sont les NRPS (quatorze clusters) et les polykétides synthèses de type I (neuf clusters). Sur 49 clusters, neuf ont été prédits avec une similarité de 100 % ; ils incluent des gènes connus qui produisent un sidérophore (desferrioxamine B), des NRP + polykétides (tétramate polycyclique macrolactame ou PTM), de la mélanine, un polykétide (alkyrésorcinol), un terpène (isorenieratene), des peptides synthétisés par la voie ribosomique et modifiés post-traduction (RiPP – deux lanthipeptides et de la keywimysine), et de l'éctoïne. Aussi, 12 clusters sur les 49 n'ont pas pu être comparés à des clusters codant pour des molécules déjà connues, dont par exemple un autre sidérophore, un terpène ou deux RiPP-like.

Pour *P. syringae* DSM 10604 (Annexe B, tableau B-2), les types de métabolites secondaires les plus prédits parmi les 22 clusters sont également les NRPS (treize clusters) suivis par les NRPS-like (six clusters). Six clusters ont été prédits avec une similarité de 100 % ; ceux-ci incluent plusieurs NRP, dont la nunapeptine/nunamycine, trois rhizomides (A, B ou C), un xenotrapeptide et un NRP + polykétide, la syringoline A. Seuls quatre clusters n'ont pas été comparés à des clusters codant pour des molécules déjà connues.

Enfin, pour *C. cladosporioides* PNF6 (Annexe B, tableau B-3), les types de métabolites secondaires les plus prédits parmi les 27 clusters sont les NRPS-like (huit clusters), suivies de polykétides synthèses de type I (sept clusters) et de NRPS (sept clusters). Un seul cluster a été prédit avec une similarité de 100 %, un polykétide (mélanine). Pour ce microorganisme, la majorité des clusters (23 sur 27) n'ont pu être comparés à des clusters déjà connus. Parmi eux se retrouvent les NRPS et NRPS-like mentionnées précédemment, ainsi que des terpènes.

3.2 Métabolites produits

3.2.1 Comparaison des spectres

Plusieurs spectres ont été obtenus à l'issue des analyses en LC-MS Q-TOF (Annexe B, figures B-1 à B-7). Ceux-ci permettent de mettre en évidence le fait que le profil de sécrétion de métabolites des co-cultures ressemble principalement à un des deux partenaires : celui de *P. syringae* + *A. oryzae* ressemble à *A. oryzae* UMIP 1042.72 seul, tout comme celui de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*. Celui de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* ressemble, quant à lui, à *Streptomyces* sp. S0162 seul.

3.2.2 Métabolites sécrétés par les différentes cultures

a. Production en monocultures

Le profil de production des microorganismes a pu être étudié et est décrit dans la figure ci-après.

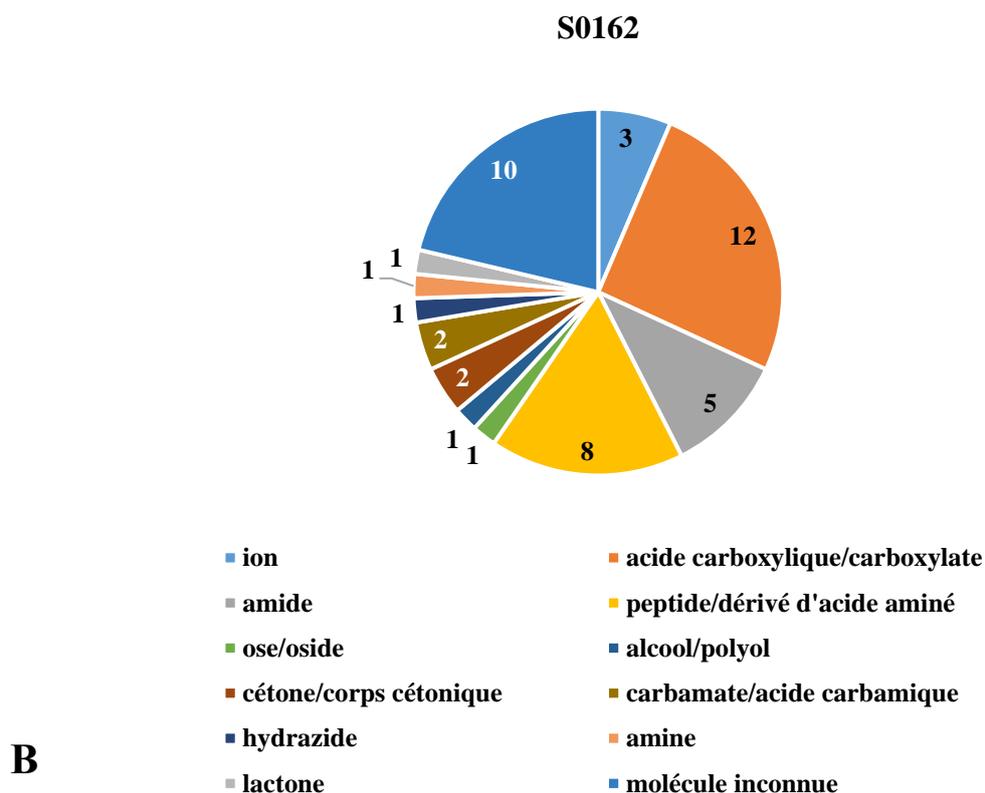
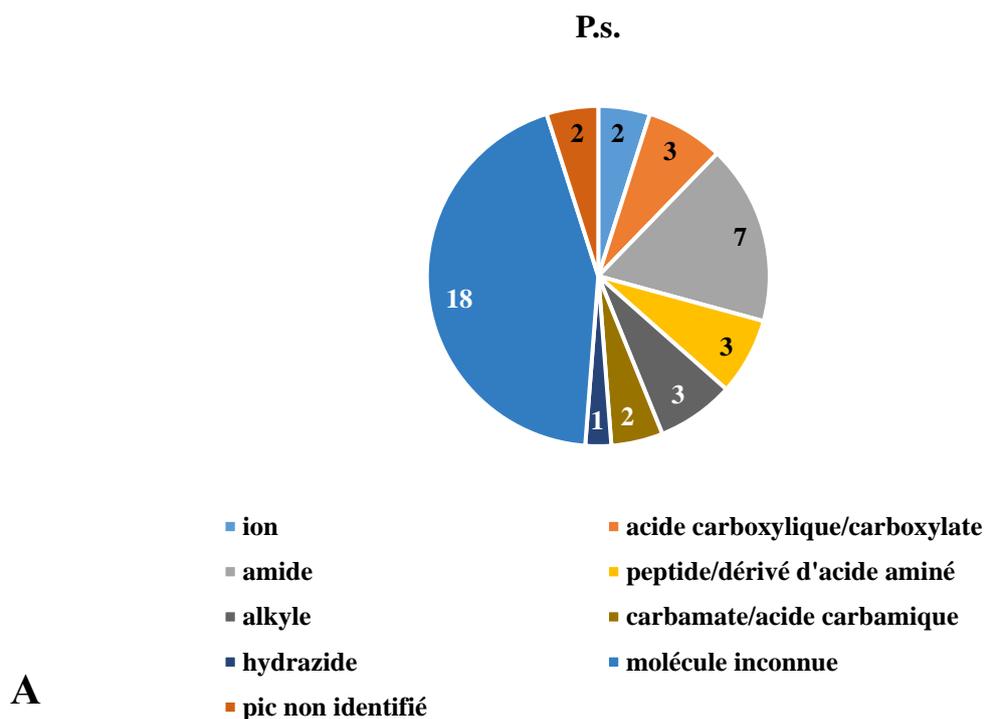


Figure 36 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires dans les monocultures des bactéries P.s. : *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et S0162 : *Streptomyces* sp. S0162, déterminées par LC-MS Q-TOF : **A**) Molécules produites par *Pseudomonas syringae* DSM

10604 seul sur un total de 46 pics. **B)** Molécules produites par *Streptomyces* sp. S0162 seul sur un total de 47 pics.

Dans le cas des deux bactéries (Figure 36), des profils de production très différents sont observés : pour *P. syringae* DSM 10604, la majorité des molécules sont inconnues (18/46), c'est-à-dire que la formule brute déterminée ne correspond à aucune molécule dans les bases de données étudiées. Le deuxième type de molécule le plus abondant sont les amides (7/46). Pour *Streptomyces* sp., la majorité des molécules sécrétées sont des acides carboxyliques et dérivés (12/48), suivies par des molécules inconnues (10/48), puis des peptides et dérivés d'acide aminé (8/48). Globalement, moins de molécules inconnues sont observées pour *Streptomyces* sp. S0162, mais elles représentent tout de même plus d'1/5 du total. En outre, une vitamine produite par *Streptomyces* sp. S0162 en particulier a pu être identifiée à partir de la base de données utilisée : l'acide pantothénique ou vitamine B₅ qui est aussi un dérivé d'acide carboxylique, de formule C₉H₁₇NO₅.

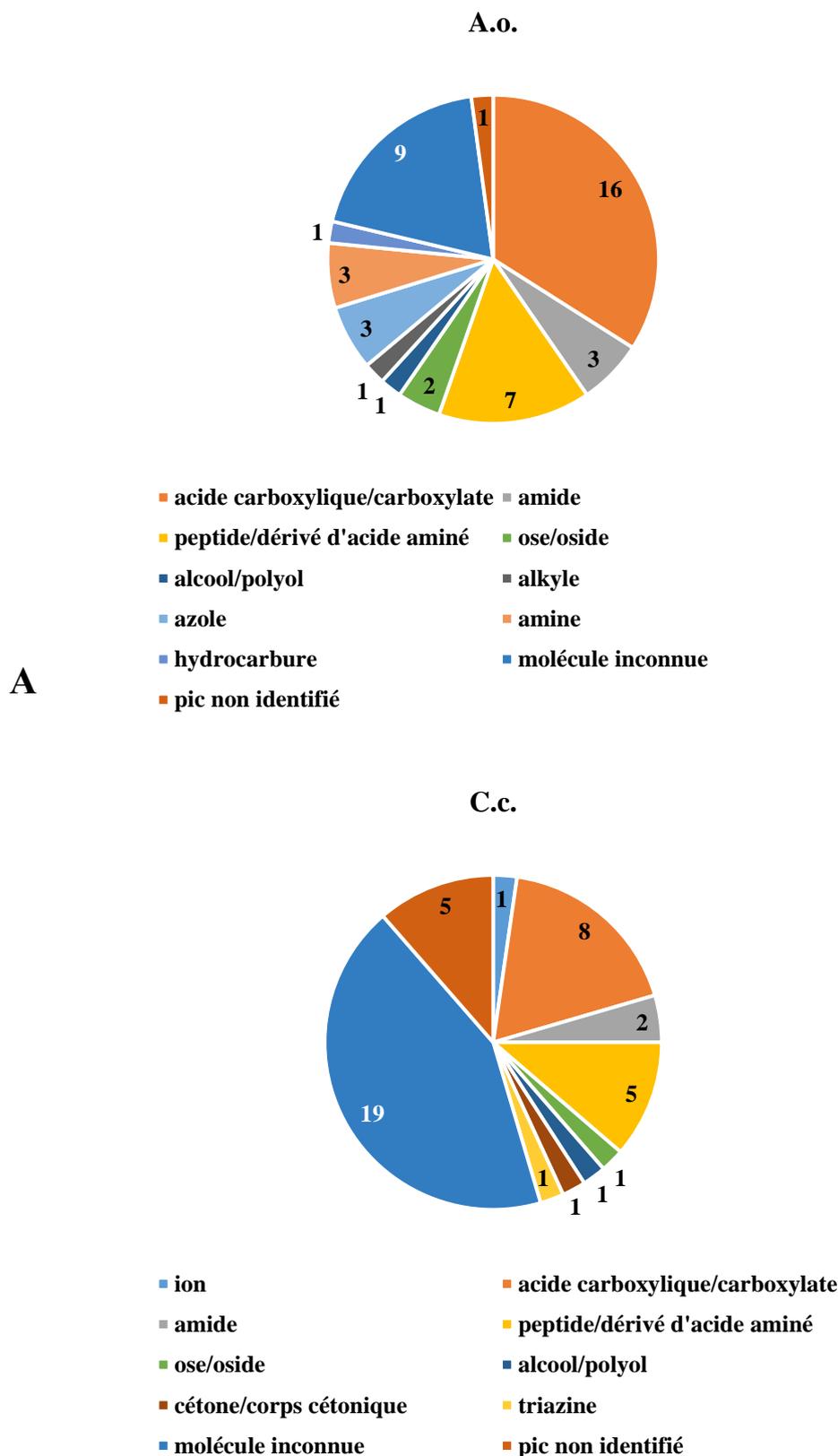


Figure 37 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires dans les monocultures des champignons A.o. : *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 et C.c. : *Cladosporium cladosporioides* PNF6, déterminées par LC-MS Q-TOF : A) Molécules produites par

Aspergillus oryzae UMIP 1042.72 seul sur un total de 47 pics. **B)** Molécules produites par *Cladosporium cladosporioides* PNF6 seul sur un total de 44 pics.

Dans le cas des monocultures de champignons (Figure 37), la majorité des métabolites sécrétés par *A. oryzae* UMIP 1042.72 sont des acides carboxyliques et dérivés (16/47), suivies par des molécules inconnues (9/47). Pour *C. cladosporioides* PNF6, la majorité des composés sont des molécules inconnues (19/44), et plus d'un dixième des pics n'ont pas pu être identifiés (aucune correspondance en m/z à une formule brute). *C. cladosporioides* PNF6 produit également une quantité importante d'acides carboxyliques (8/44).

b. Production des co-cultures

Les profils des métabolites secondaires sécrétés par les trois co-cultures sélectionnées ont ensuite été étudiés.

***P. syringae* DSM 10604 + *A. oryzae* UMIP 1042.72**

Molécules produites par P.s. + A.o.

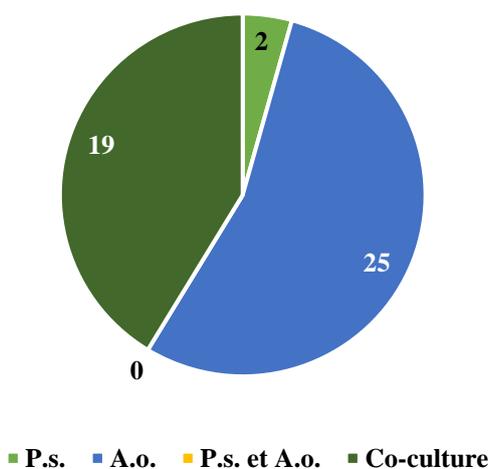


Figure 38 : Répartition des molécules produites dans la co-culture *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae* ; P.s. : molécules également retrouvées dans le surnageant de la monoculture de *Pseudomonas syringae* DSM 10604, A.o. : molécules également retrouvées dans le surnageant de la monoculture de *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, P.s. et A.o. : molécules retrouvées dans le surnageant des monocultures de *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, Co-culture : molécules présentes uniquement dans la co-culture.

On peut noter dans la figure 38 que les molécules secrétées dans la co-culture de *P. syringae* + *A. oryzae* sont majoritairement retrouvées dans la production d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 en monoculture (25/46). Une très faible proportion se retrouve chez *P. syringae* DSM 10604 (2/46) et aucune molécule ne se retrouve chez les deux partenaires. L'autre proportion importante de molécules représente celles qui ne sont retrouvées qu'en co-culture (19/46).

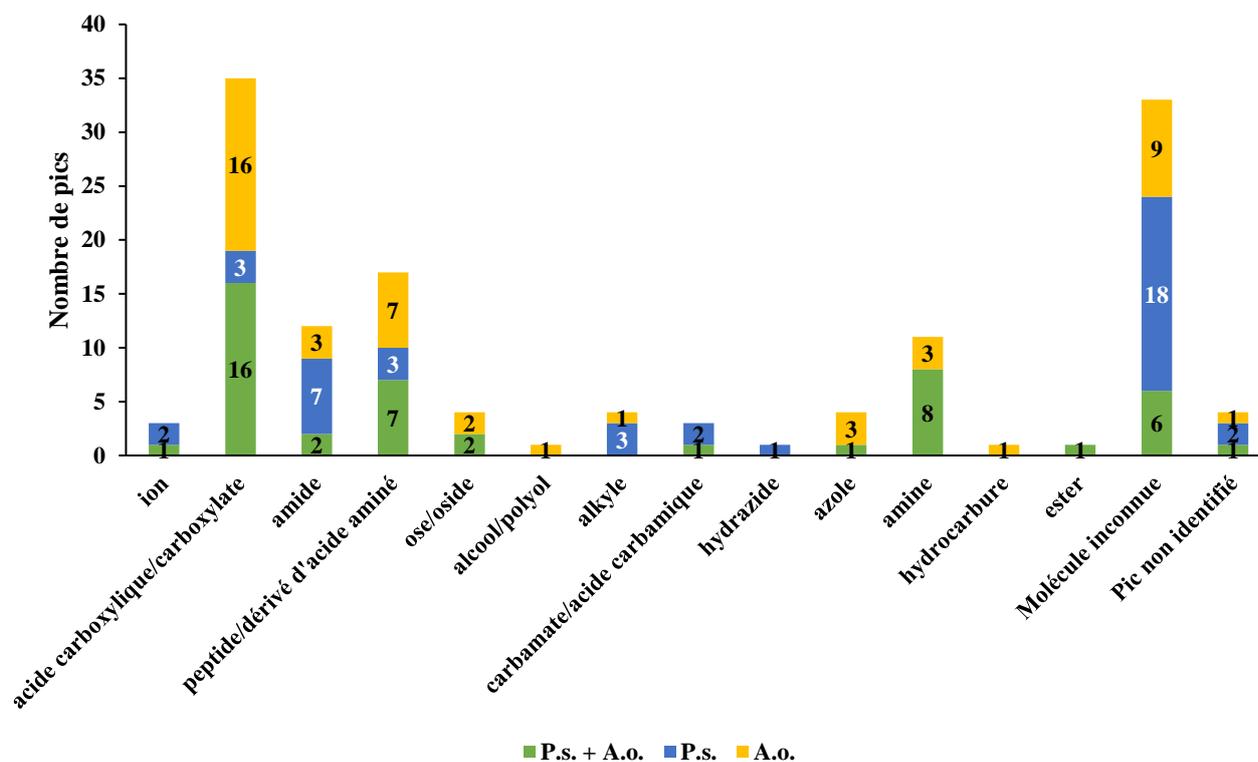


Figure 39 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires produites dans la co-culture *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae* et les monocultures *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 seules.

Dans la figure 39, la majorité des molécules (toutes cultures confondues sans regroupement des molécules identiques) sont des acides carboxyliques et dérivés, ainsi que des molécules inconnues. La plupart des familles retrouvées chez *P. syringae* DSM 10604, *A. oryzae* UMIP 1042.72 et leur co-culture sont ces dernières, mais aussi des peptides et dérivés d'acide aminé, des amides, et des amines. En outre, certaines familles sont uniquement présentes dans une culture ou éventuellement deux, comme les amines, uniquement présents dans les surnageants de la monoculture d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 et la co-culture.

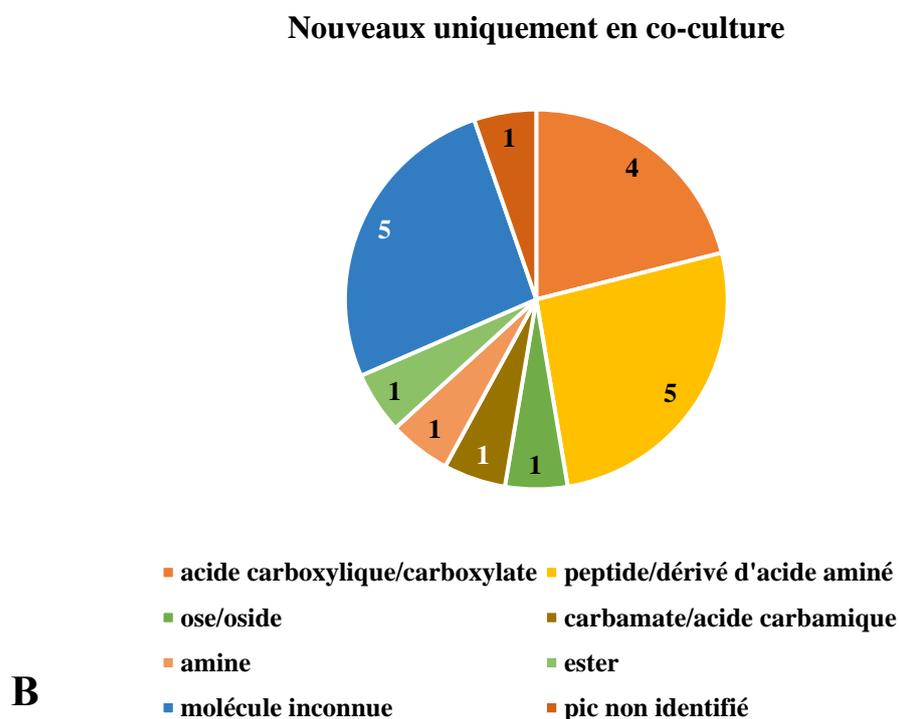
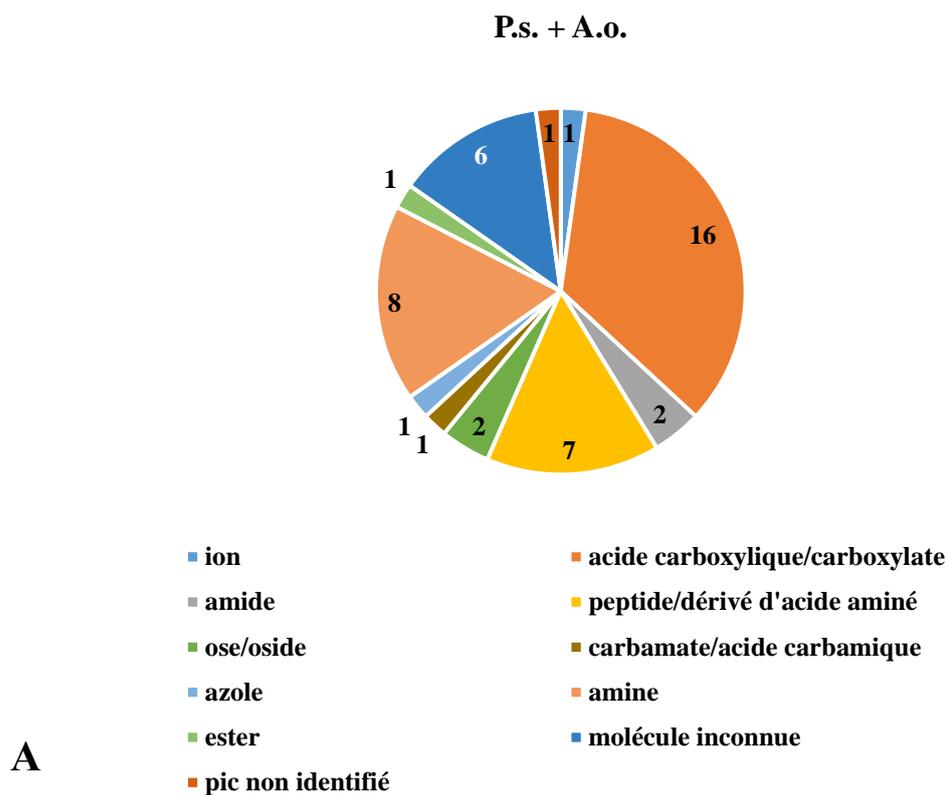


Figure 40 : Répartition des familles putatives de métabolites secondaires dans la co-culture *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae* : **A)** P.s. + A.o. : tous les pics considérés (46). **B)** Seuls les pics détectés uniquement dans la co-culture sont considérés (19).

Si l'on considère l'ensemble des familles de métabolites secondaires secrétés dans la co-culture (Figure 40A), soit 46 molécules, un profil très similaire à celui d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 seul est observé, avec une majorité d'acides carboxyliques et de dérivés (16/46), et un nombre important de peptides et dérivés d'acide aminé (7/46). Cependant, dans le surnageant de la co-culture *P. syringae* + *A. oryzae*, un nombre plus important d'amines est observé (8/46) par rapport à la monoculture *A. oryzae* UMIP 1042.72 seule (3/47) (Figure 37A).

Dans les pics uniquement observés en co-culture (Figure 40B), certaines familles de molécules sont majoritaires : les peptides et dérivés d'acide aminé (5/19), les molécules inconnues (5/19) et les acides carboxyliques et dérivés (4/19). D'autres familles se retrouvent, mais en quantité beaucoup moins importante, comme un ose/oside, un dérivé d'ester, un dérivé de carbamate, ou encore un dérivé d'amine. En outre, le seul pic non identifié observé en co-culture n'est pas détecté dans les monocultures correspondantes. Enfin, une seule molécule a été identifiée de façon nominative à travers la base de données : elle a été produite en co-culture uniquement, et sa formule brute $C_{10}H_9NO_2$ correspondrait à celle de l'acide indole-3-acétique ou auxine, qui est un dérivé d'acide carboxylique.

***Streptomyces* sp. S0162 + *A. oryzae* UMIP 1042.72**

Molécules produites par S0162 + A.o.

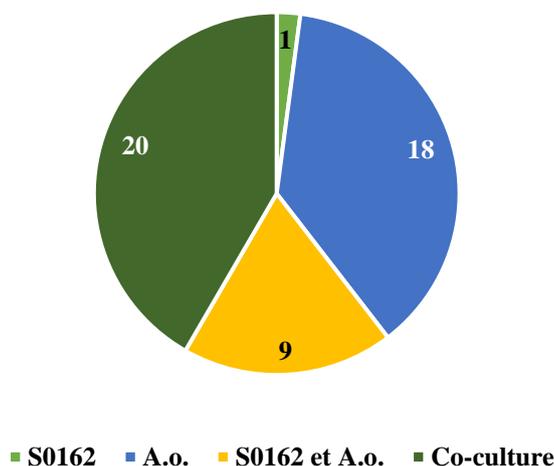


Figure 41 : Répartition des molécules produites dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae* ; S0162 : molécules présentes chez *Streptomyces* sp. S0162, A.o. : molécules présentes chez *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, S0162 et A.o. : molécules présentes chez *Streptomyces* sp. S0162 et chez *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, Co-culture : molécules présentes uniquement dans la co-culture.

Dans la figure 41, une bonne partie des molécules secrétées en co-culture sont là encore produites par *A. oryzae* UMIP 1042.72 (18/48), ou bien par *Streptomyces* sp. S0162 et *A. oryzae* UMIP 1042.72 (9/48). En outre, une seule molécule présente en co-culture est retrouvée uniquement dans la monoculture de *Streptomyces* sp. S0162. Au total, 20 molécules sur 48 se retrouvent uniquement en co-culture, en proportion majoritaire, témoignant encore de la synthèse de composés n'étant pas détectés dans les monocultures correspondantes.

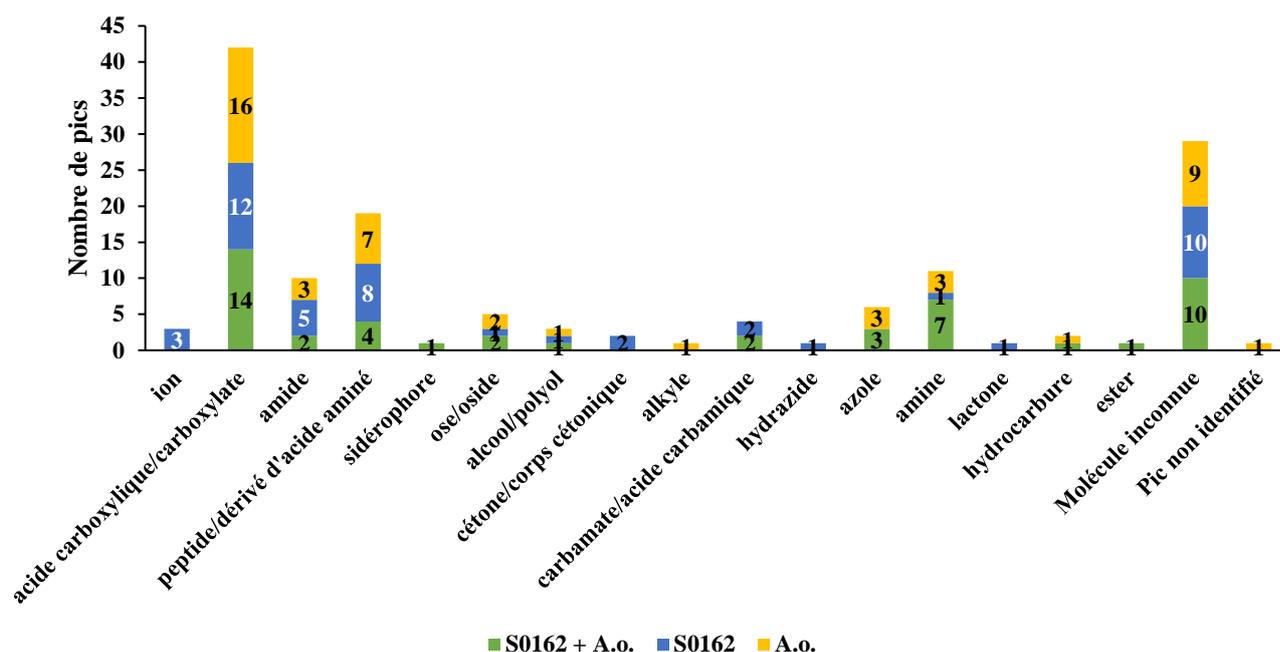


Figure 42 : Répartition des familles putatives de molécules produites dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae* et les monocultures *Streptomyces* sp. S0162 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 seules.

Dans la figure 42 la majorité des molécules retrouvées dans toutes les cultures confondues sont encore une fois les acides carboxyliques et dérivés, les molécules inconnues, et les peptides et dérivés d'acide aminé. De plus, en considérant les familles ayant plus de cinq pics, des amides et des amines sont retrouvés, comme pour le couple précédent, ainsi que des azoles. En outre, un grand nombre de familles/groupes se retrouve uniquement dans une culture, en particulier chez *Streptomyces* sp. S0162 (Figure 36B) où l'on retrouve quatre familles/groupes non présentes dans la co-culture ou même chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 (Figure 37A).

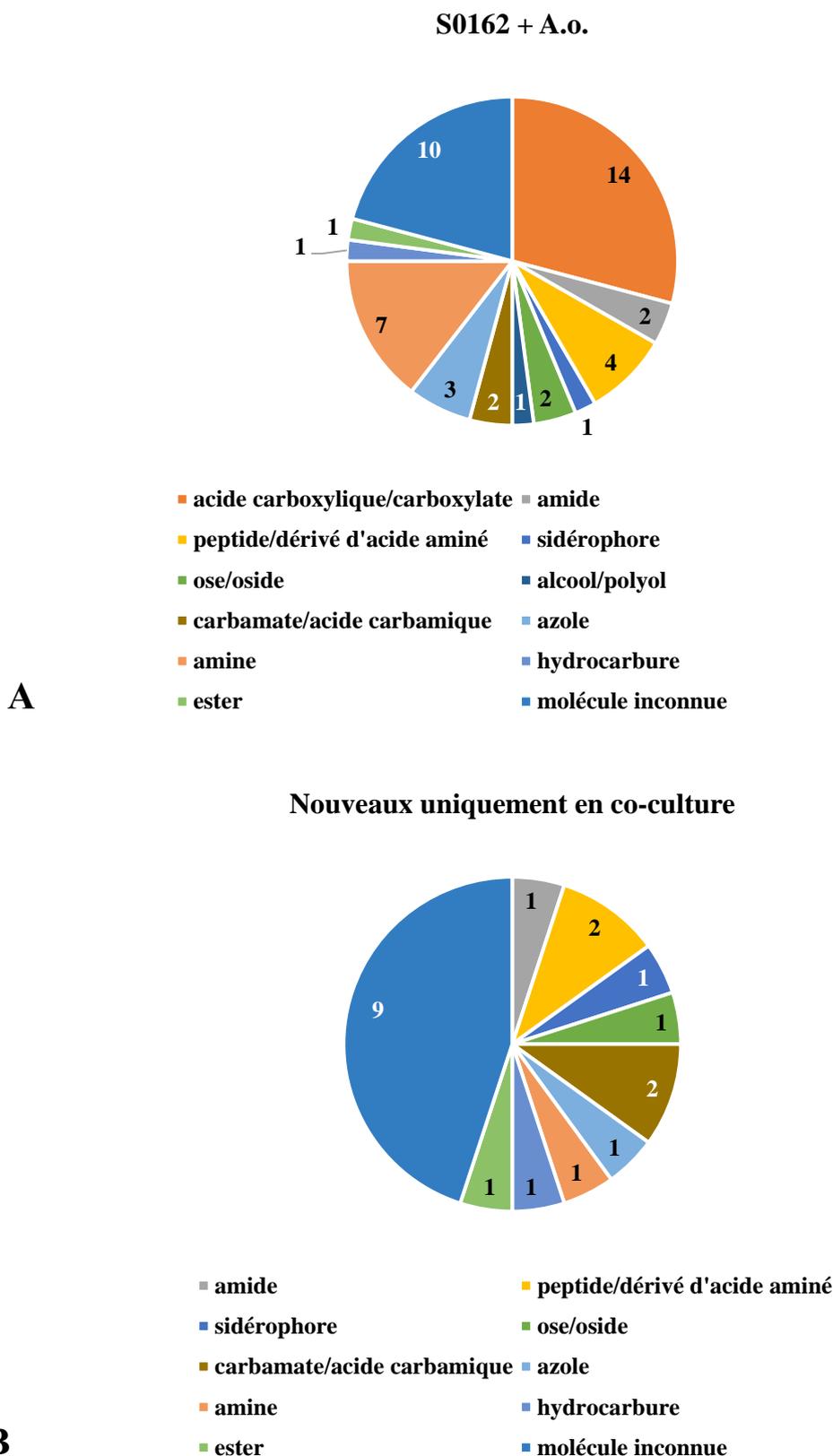


Figure 43 : Répartition des familles putatives dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae* : **A**) Tous les pics considérés (48). **B**) Seuls les pics détectés uniquement dans la co-culture sont considérés (20).

En considérant la co-culture dans son ensemble (Figure 43A), un profil de production similaire à *A. oryzae* UMIP 1042.72 seul est encore observé (Figure 37A). En effet, la majorité des métabolites détectés en co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* appartiennent aux acides carboxyliques (14/48) suivies par les molécules inconnues (10/48) puis des amines (7/48) dont le nombre est plus important en co-culture que dans les monocultures (3/48 chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 et 1/47 chez *Streptomyces* sp. S0162 (Figures 37A et 36B respectivement). Dans les molécules uniquement retrouvées en co-culture (Figure 43B), les acides carboxyliques sont absents : l'intégralité de ces acides est en effet retrouvée chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 en monoculture et pour certains également chez *Streptomyces* sp. S0162 ; la majorité des molécules sont inconnues (9/20), suivies par des carbamates et dérivés (2/20) et des peptides et dérivés d'acide aminé (2/20). Parmi toutes les molécules synthétisées *de novo*, la synthèse et la sécrétion d'un sidérophore uniquement en co-culture, la desferrioxamine E ou nocardamine peut être notée, de formule $C_{27}H_{48}N_6O_9$.

***Streptomyces* sp. S0162 + *C. cladosporioides* PNF6**

Molécules produites par S0162 + C.c.

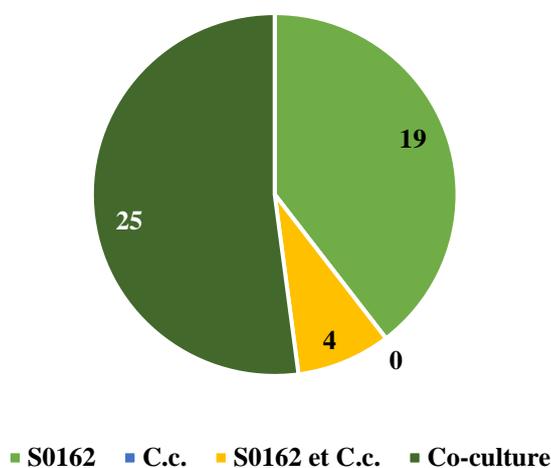


Figure 44 : Répartition des molécules produites dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* ; S0162 : molécules présentes chez *Streptomyces* sp. S0162, C.c. : molécules présentes chez *Cladosporium cladosporioides* PNF6, S0162 et C.c. : molécules présentes chez *Streptomyces* sp. S0162 et chez *Cladosporium cladosporioides* PNF6, Co-culture : molécules présentes uniquement dans la co-culture.

Dans la figure 44, plus de la moitié des molécules détectées sont présentes uniquement en co-culture (25/48). 19 molécules sur 48 sont également présentes chez *Streptomyces* sp. S0162 et

le reste des molécules (4/48) se retrouvent chez *Streptomyces* sp. S0162 et chez *C. cladosporioides* PNF6. Aucun des principaux métabolites secondaires sécrétés dans la co-culture n'est retrouvé que chez *C. cladosporioides* PNF6. La majorité des molécules identifiées en co-culture se retrouvent dans le surnageant de monoculture de la bactérie (*Streptomyces* sp. S0162) contrairement aux deux co-cultures précédentes où la majorité des molécules se retrouvaient dans le surnageant de monoculture du champignon (*A. oryzae*).

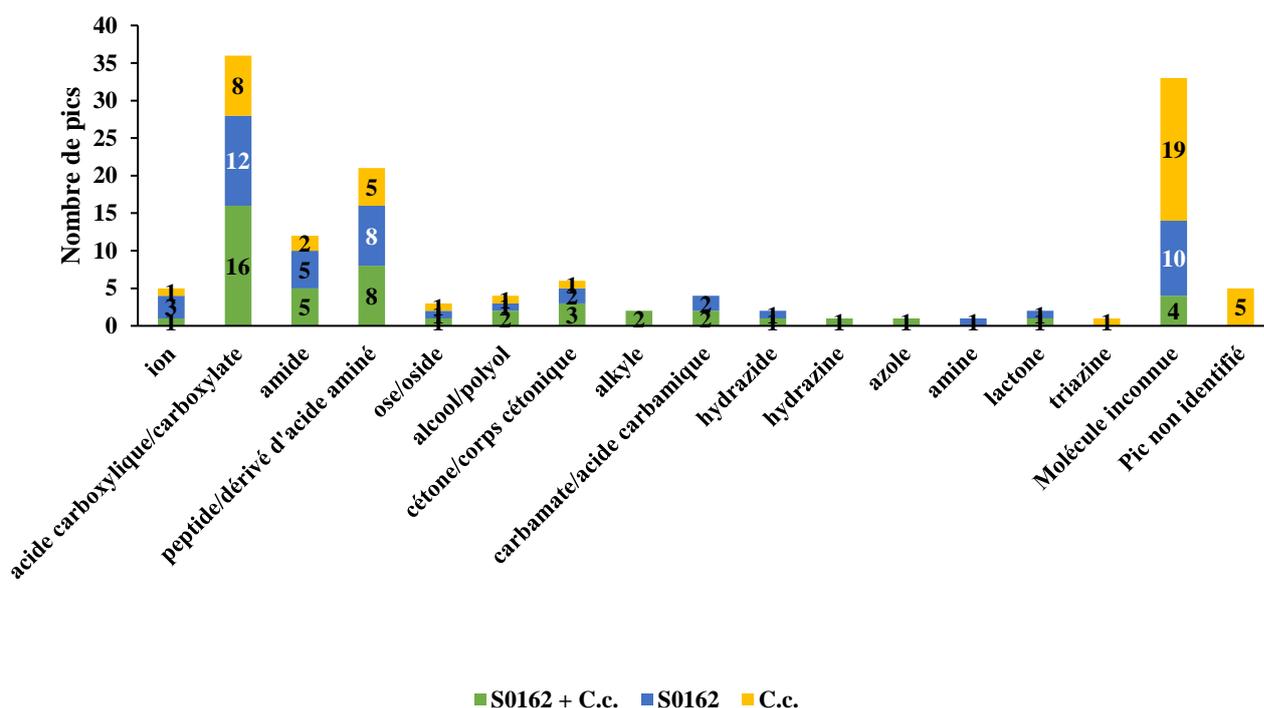


Figure 45 : Familles putatives des molécules produites dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* et les monocultures *Streptomyces* sp. S0162 et *Cladosporium cladosporioides* PNF6 seules.

Dans la figure 45, la majorité des métabolites sécrétés (toutes cultures confondues) sont là encore des acides carboxyliques et dérivés, des molécules inconnues et des peptides et dérivés d'acide aminé ; à ceux-ci peuvent être ajoutés les amides et les cétones et corps cétoniques. Globalement, la co-culture est celle qui montre le plus grand nombre de familles/groupes non retrouvés dans les monocultures, avec trois groupes qui ne sont pas détectés chez *Streptomyces* sp. S0162 ou *C. cladosporioides* PNF6 seuls : les alkyles, azoles et hydrazines.

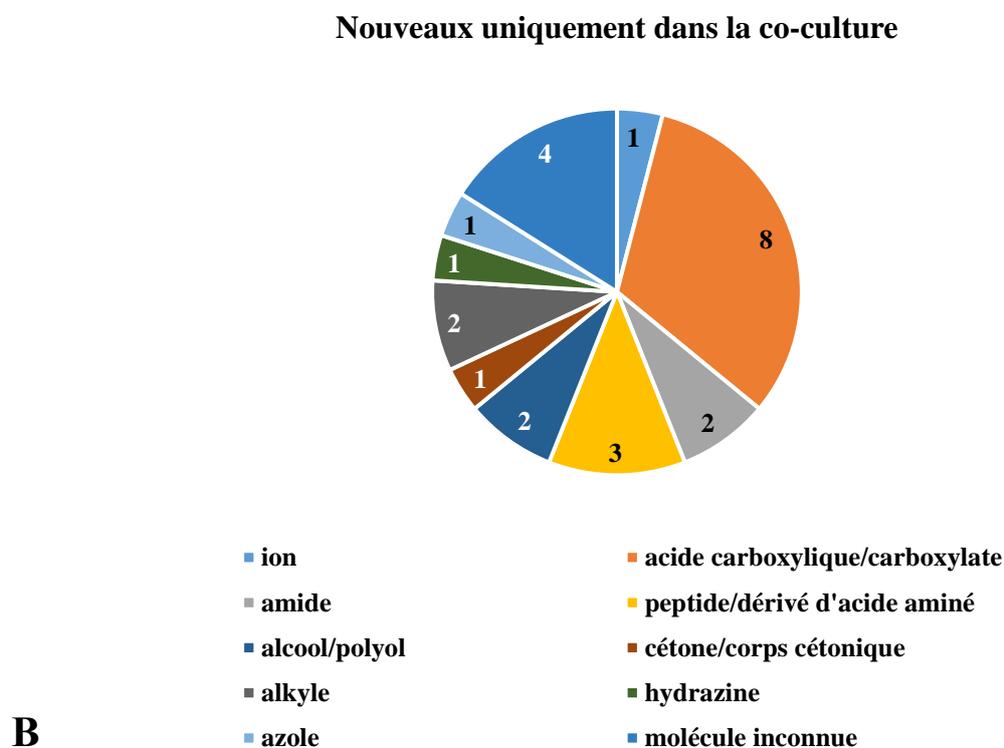
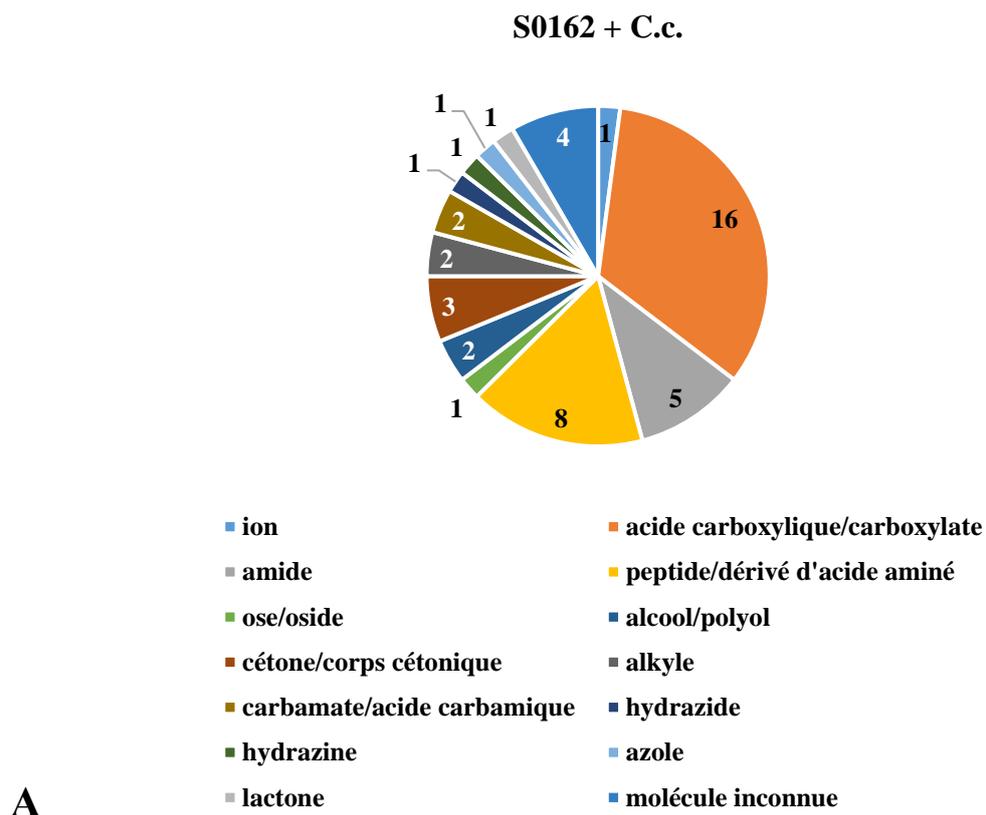


Figure 46 : Répartition des familles putatives dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* : **A)** Tous les pics considérés (48). **B)** Seuls les pics détectés uniquement dans la co-culture sont considérés (25).

Si l'on considère la co-culture dans son ensemble (Figure 46A), un profil de types de molécules similaire à celui de *Streptomyces* sp. S0162 seul peut être observé. Dans la co-culture, une majorité d'acides carboxyliques (16/48), puis de peptides et dérivés d'acide aminé (8/48) peut être observée. Seules 4 molécules sont inconnues dans la co-culture, contre 19 chez *C. cladosporioides* PNF6 et 10 chez *Streptomyces* sp. S0162 seuls. Cependant, en considérant les molécules uniquement présentes dans la co-culture, les 4 molécules inconnues ne sont pas détectées dans les monocultures, faisant d'elles le deuxième groupe le plus important après les acides carboxyliques et dérivés (8/25). Plusieurs molécules ont pu être identifiées à travers les bases de données dans cette co-culture ; l'acide pantothénique produit par *Streptomyces* sp. S0162 est aussi produit dans cette co-culture (alors qu'il n'est pas retrouvé dans la co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*), et une autre vitamine a pu être identifiée. Il s'agit de la niacine ou vitamine B₃, qui est un autre acide carboxylique, de formule C₆H₅NO₂. En outre, une autre molécule a été identifiée comme pouvant être un métabolite secondaire, la benarthine, un peptide de formule C₁₇H₂₅N₅O₇.

Globalement, bien que peu de molécules aient été identifiées grâce à la recherche dans les bases de données, il est tout de même possible de noter des profils de métabolites sécrétés en co-cultures qui apparaissent similaires à une des deux monocultures, soit le champignon *A. oryzae* UMIP 1042.72 pour *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *P. syringae* + *A. oryzae* ; soit la bactérie *Streptomyces* sp. S0162 pour la co-culture *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. Dans le cas de la co-culture *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, près de la moitié des métabolites nouvellement produits étaient inconnus dans les bases de données. Enfin, certains métabolites ont été identifiés à travers les bases de données et ne sont détectés qu'en co-culture : l'auxine chez *P. syringae* + *A. oryzae*, la desferrioxamine E chez *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et la niacine et la benarthine chez *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*.

3.3 Analyses protéomiques

Les analyses protéomique et peptidomique ont uniquement été réalisées pour les surnageants des monocultures *P. syringae* DSM 10604 et *A. oryzae* UMIP 1042.72 ainsi que pour la co-culture *P. syringae* + *A. oryzae* ; en effet les deux souches sont de collection, leurs génomes sont séquencés, ce qui permet l'identification des protéines et peptides (origine et séquence).

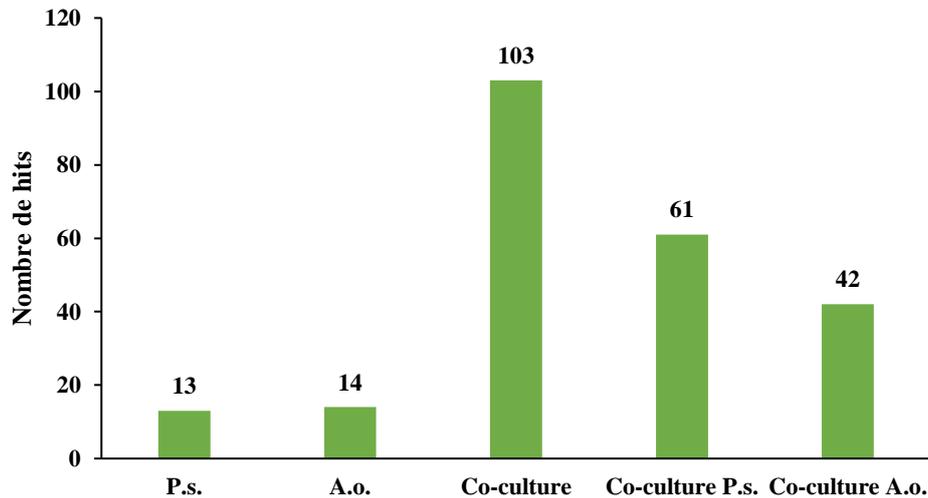


Figure 47 : Nombre de hits peptidiques et protéiques en considérant : P.s. : le surnageant de monoculture de *Pseudomonas syringae* DSM 10604, A.o. : le surnageant de monoculture de *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, Co-culture : le surnageant de la co-culture P.s. + A.o., Co-culture *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*, P.s. : les protéines et peptides sécrétés par *Pseudomonas syringae* DSM 10604 en co-culture, Co-culture A.o. : les protéines et peptides sécrétés par *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 en co-culture.

Dans la figure 47, 13 peptides et protéines sont détectés dans le surnageant de la monoculture *P. syringae* DSM 10604. Ces peptides et protéines correspondent à des séquences protéiques connues du genre *Pseudomonas* ; dans le cas d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, 14 sont retrouvés. En co-culture, ce nombre est très supérieur, culminant à 103 correspondances, dont 61 étant identifiées comme provenant de *P. syringae* DSM 10604, et 42 sécrétées par *A. oryzae* UMIP 1042.72.

En s'intéressant aux voies fonctionnelles dans lesquelles sont impliqués ces peptides et protéines, des informations intéressantes peuvent être retrouvées, tout d'abord dans le cas de *P. syringae* DSM 10604 et *A. oryzae* UMIP 1042.72 en monoculture.

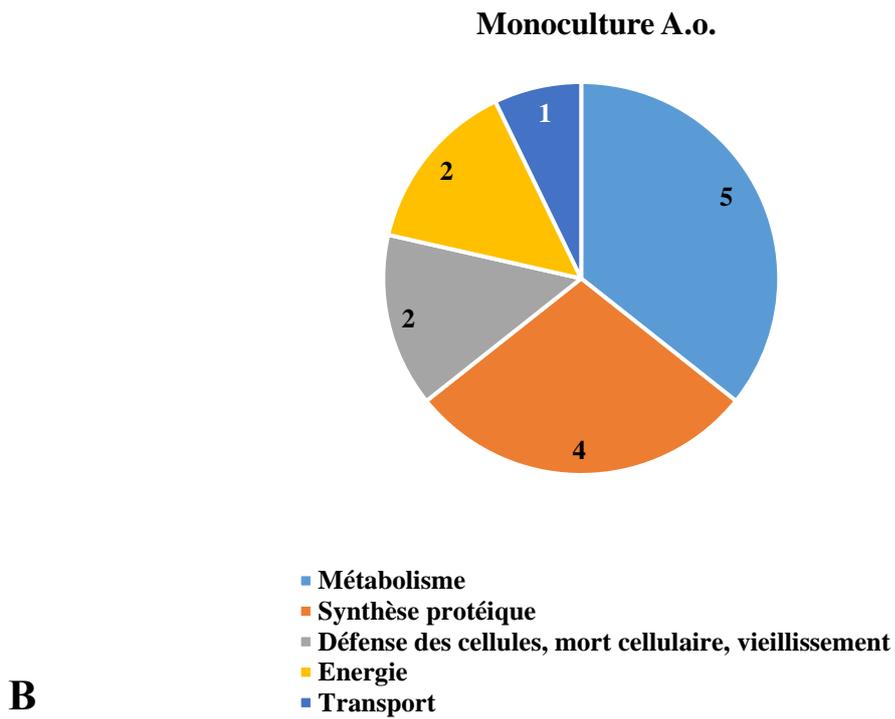
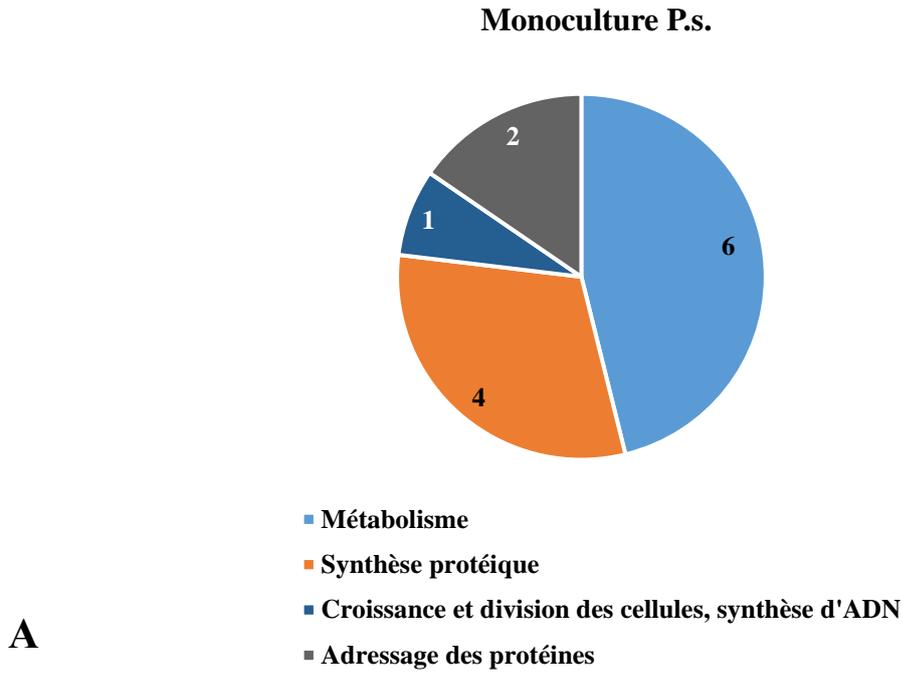


Figure 48 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les protéines et peptides synthétisés en monoculture par *Pseudomonas syringae* DSM 10604 (**A**) et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 (**B**) seules.

Dans la figure 48, le détail des voies fonctionnelles permet d'observer que la majorité des protéines et peptides retrouvées dans les surnageants des deux monocultures correspondent à des protéines impliquées dans le métabolisme et la synthèse protéique, avec respectivement six et quatre hits sur 13 y correspondant pour *P. syringae* DSM 10604 et cinq et quatre hits sur 14 y correspondant pour *A. oryzae* UMIP 1042.72. En outre, dans le surnageant de la monoculture *P. syringae* DSM 10604, des protéines sécrétées en rapport avec la croissance de la bactérie (1/13) et l'adressage des protéines (2/14) ont pu être identifiées tandis qu'*A. oryzae* UMIP 1042.72 exprime en monoculture des protéines des voies fonctionnelles de l'énergie (2/14) et du transport (1/14) en plus de la défense des cellules (2/14) sous-entendant la présence d'un stress.

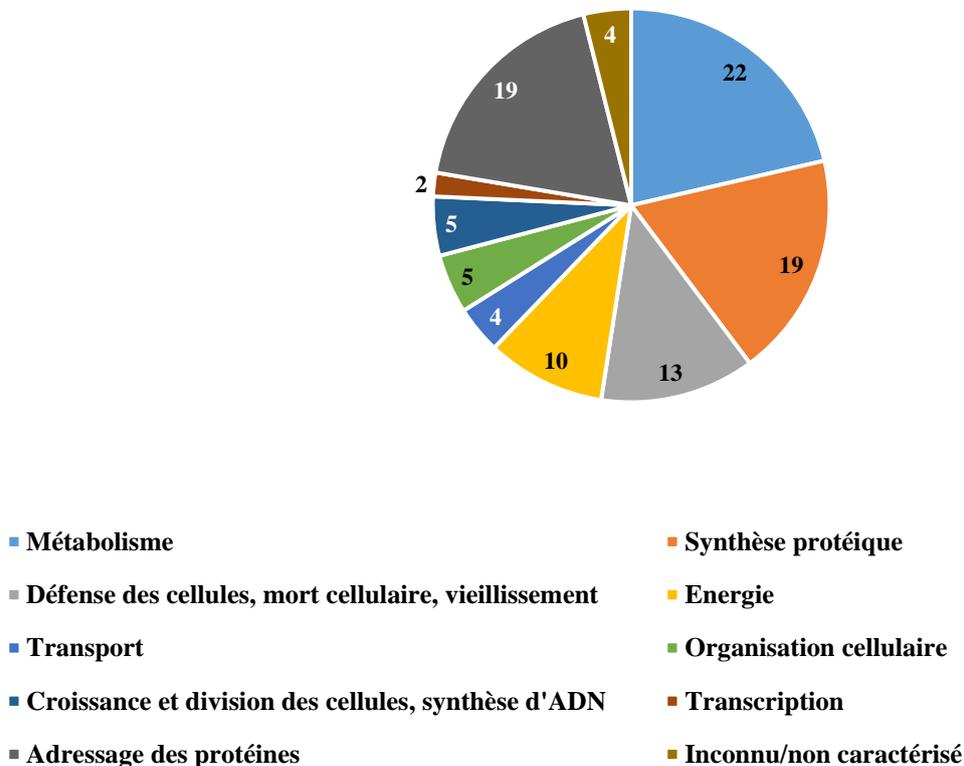
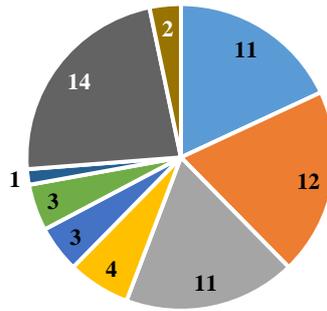


Figure 49 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les protéines et peptides synthétisés par la co-culture *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae*.

Dans la co-culture *P. syringae* + *A. oryzae* (Figure 49), les sécrétions protéiques et peptidiques appartiennent majoritairement aux voies fonctionnelles du métabolisme (22/103), de la

synthèse protéique (19/103) et de l'adressage des protéines (19/103) qui étaient des voies fonctionnelles déjà présentes en monoculture. Cependant, de nouvelles voies sont apparues, telles que la défense des cellules (13/103), l'organisation cellulaire (5/103). En particulier, 4 hits correspondent à des protéines dont l'activité n'a pas encore été caractérisée.

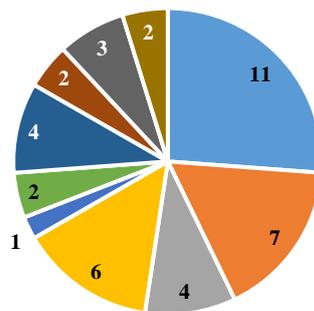
P.s. co-culture



- Métabolisme
- Défense des cellules, mort cellulaire, vieillissement
- Transport
- Croissance et division des cellules, synthèse d'ADN
- Inconnu/non caractérisé
- Synthèse protéique
- Energie
- Organisation cellulaire
- Adressage des protéines

A

A.o. co-culture



- Métabolisme
- Défense des cellules, mort cellulaire, vieillissement
- Transport
- Croissance et division des cellules, synthèse d'ADN
- Adressage des protéines
- Synthèse protéique
- Energie
- Organisation cellulaire
- Transcription
- Inconnu/non caractérisé

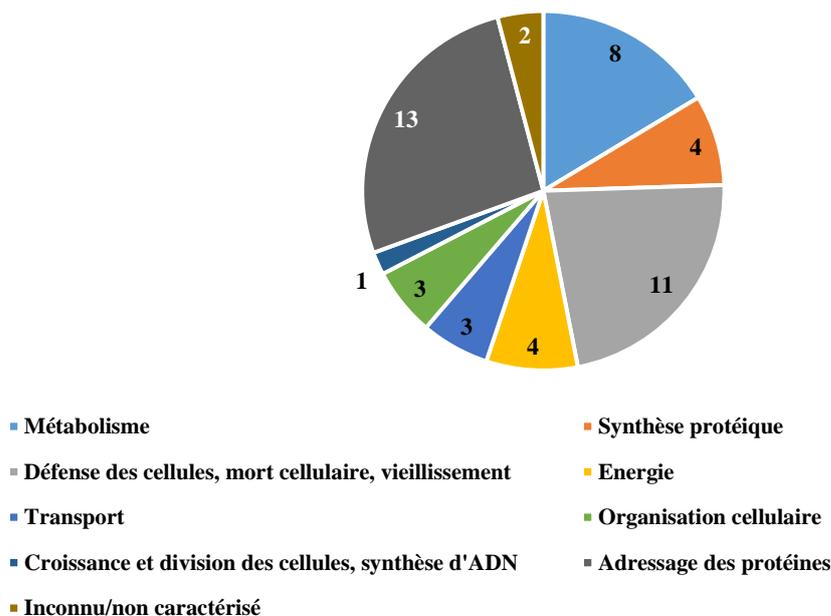
B

Figure 50 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les peptides et protéines identifiés comme étant synthétisés par *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 lorsqu'ils sont en co-culture.

Pour chacun des microorganismes impliqués dans la co-culture, la figure 50 présente le détail des protéines et de peptides sécrétées dans le surnageant de co-culture. Des réponses différentielles des microorganismes en co-culture sont ainsi observées, par rapport aux monocultures mais aussi entre eux. *P. syringae* DSM 10604 présente une majorité de hits correspondant à l'adressage des protéines (14/61), la synthèse protéique (12/61), mais aussi le métabolisme (11/61) et la défense des cellules (11/61). Il apparaît qu'en co-culture, *P. syringae* DSM 10604 exprime des protéines impliquées dans la synthèse et le contrôle de protéines ainsi que vers une réponse à un stress.

Dans le cas d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, les protéines impliquées dans le métabolisme sont particulièrement exprimées lors de la co-culture (11/42), suivie par l'expression de protéines impliquées dans la synthèse protéique (7/42) et la production d'énergie par le champignon (6/42). La croissance et la division des cellules représente une part plus importante chez le champignon que chez *P. syringae* DSM 10604 (4/42 contre 1/61 pour *P. syringae* DSM 10604). En outre, *A. oryzae* UMIP 1042.72 présente des peptides et protéines appartenant à la voie de la transcription. Aussi, *A. oryzae* UMIP 1042.72 semble se tourner vers la synthèse de métabolites ainsi que la croissance ; il montre également une réponse au stress, cependant moindre en comparaison avec *P. syringae* DSM 10604 (4/42 contre 11/61).

P.s. co-culture uniquement



A.o. co-culture uniquement

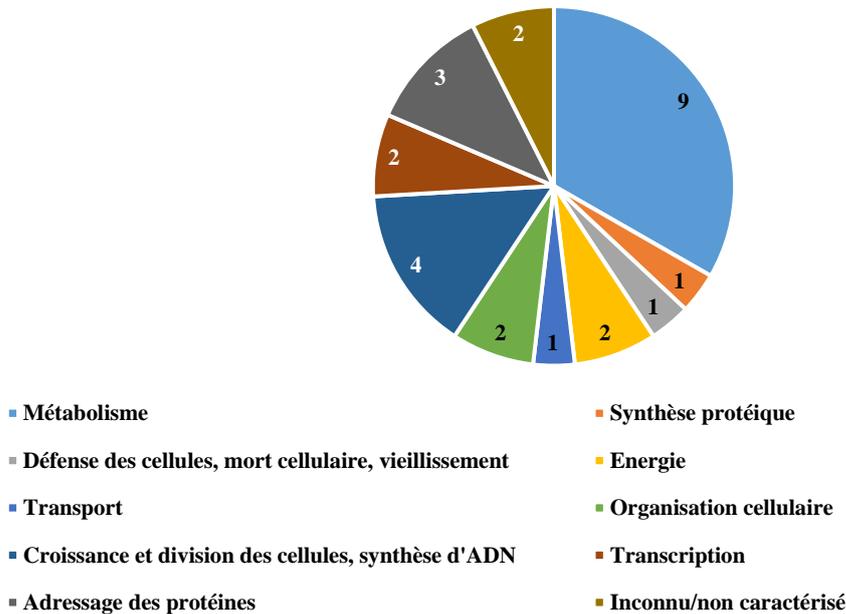


Figure 51 : Voies fonctionnelles auxquelles appartiennent les peptides et protéines identifiés comme étant synthétisés par *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 uniquement dans la co-culture.

Si l'on s'intéresse à présent aux protéines uniquement détectées en co-culture (Figure 51), pour *P. syringae* DSM 10604, les protéines et peptides synthétisés sont majoritairement liés à la défense des cellules (11/48) et à l'adressage des protéines (13/48), confirmant la mise en place d'une réponse particulièrement liée au contrôle des protéines et à la protection de *P. syringae* DSM 10604 en présence d'*A. oryzae* UMIP 1042.72. Pour ce dernier, le métabolisme ressort en premier (9/28), suivi de la croissance et de la division des cellules (4/28) ainsi que l'adressage des protéines. En outre, une protéine non caractérisée est retrouvée. Aussi la réponse d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 en présence de *P. syringae* DSM 10604 semble être la synthèse de métabolites ou l'activation de voies métaboliques en particulier et la croissance du champignon.

Il est possible, en plus de ces observations liées aux voies fonctionnelles, de regarder plus en détail ce qui a été sécrété par les différents microorganismes en monoculture et en co-culture (Tableau 14).

Tableau 14 : Nombres de hits liés aux différentes voies fonctionnelles pour *Pseudomonas syringae* DSM 10604 et *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 en monoculture, en co-culture, ainsi que les nouvelles sécrétions uniquement retrouvées en co-culture.

Voies fonctionnelles	P.s. seul	A.o. seul	P.s. co-culture	A.o. co-culture	P.s. co-culture NU	A.o. co-culture NU
Métabolisme						
Métabolisme des composés carbonés et des glucides						
<i>Utilisation des composés carbonés et des glucides</i>	3	3	3	6	1	5
<i>Autres activités de métabolisme des composés carbonés et des glucides</i>				1		1
Métabolisme des acides aminés						
<i>Biosynthèse des acides aminés</i>	1		1			
<i>Dégradation des acides aminés (catabolisme)</i>				2		2
Métabolisme des vitamines, cofacteurs et groupes prosthétiques						
<i>Biosynthèse des vitamines, cofacteurs et groupes prosthétiques</i>		1				
Métabolisme des nucléotides						
<i>Dégradation des polynucléotides</i>			1		1	
<i>Autres activités de métabolismes des nucléotides</i>		1				
Métabolisme des lipides, acides gras et isoprénoïdes						
			4		4	
Synthèse protéique						
Protéines ribosomiques	4	2	8	1		
Traduction						
<i>Initiation</i>			2		2	

Chapitre 4 : Analyse des surnageants

<i>Elongation</i>	2	2	5	2	
<i>Autres activités de traduction</i>			1		1
Défense des cellules, mort cellulaire, vieillissement					
Réponse de stress	2	10	4	10	
Réparation d'ADN		1		1	
Energie					
Respiration	2	2	6	2	3
Glycolyse et gluconéogénèse		1		1	
Autres activités de génération d'énergie		2		2	
Transport					
ATPase membranaire	1				
Transporteurs ABC		1	1	1	1
Autres transporteurs		2		2	
Organisation cellulaire					
Organisation de la paroi cellulaire		1	2	1	2
Organisation de la membrane plasmique		2		2	
Croissance et division des cellules, synthèse d'ADN					
Synthèse et réplication d'ADN		1		1	
Recombinaison et réparation de l'ADN	1				
Bourgeonnement, polarité des cellules et formation de filaments			2		2
Contrôle du cycle cellulaire et mitose			2		2

Chapitre 4 : Analyse des surnageants

Transcription						
Synthèse d'ARNt					1	1
Autres activités de transcription					1	1
Adressage des protéines						
Repliement et stabilisation des protéines	2		9	2	8	2
Transport des protéines			1		1	
Protéolyse	2		1	3		3
Autres activité d'adressage des protéines			4		4	
Inconnu/non caractérisé						
Total	13	14	61	42	48	28

Dans le tableau 14, comme dans les figures précédentes, la co-culture a induit l'activation de voies fonctionnelles très diversifiées pour *P. syringae* DSM 10604 et *A. oryzae* UMIP 1042.72. L'une des voies majoritaires est l'utilisation des composés carbonés et des glucides pour les deux microorganismes, que ce soit en mono- ou en co-culture. En outre, le métabolisme des lipides et des acides gras prend également de l'importance chez *P. syringae* DSM 10604 en co-culture. Quant à *A. oryzae* UMIP 1042.72, son métabolisme s'oriente vers la dégradation des acides aminés en co-culture. Dans le détail de la synthèse protéique, qui est une autre voie fonctionnelle importante pour *P. syringae* DSM 10604 et *A. oryzae* UMIP 1042.72, une importance des protéines ribosomiques pour *P. syringae* DSM 10604 est remarquée, que ce soit en co-culture ou en monoculture, tandis que la traduction (avec des facteurs d'élongation) est plus représentée chez *A. oryzae* UMIP 1042.72. Si l'on s'intéresse à la défense des cellules, la réponse de *P. syringae* DSM 10604 en co-culture est en rapport avec un stress subi mais aussi avec la réparation d'ADN ; pour *A. oryzae* UMIP 1042.72, seule une réponse au stress est observée. Pour l'énergie, l'activité majoritaire pour *A. oryzae* UMIP 1042.72 est dans la respiration cellulaire que ce soit en mono- ou co-culture, tandis que pour *P. syringae* DSM 10604, la co-culture impacte l'ensemble des voies énergétiques impliquées depuis la glycolyse et la gluconéogenèse jusqu'à la respiration. La voie fonctionnelle de l'organisation cellulaire, qui apparaît uniquement en co-culture, met également en jeu des protéines et peptides de la paroi cellulaire pour *A. oryzae* UMIP 1042.72, et de la paroi et de la membrane cellulaire pour *P. syringae* DSM 10604. La croissance cellulaire chez *P. syringae* DSM 10604 concerne les voies fonctionnelles de la synthèse et répliation de l'ADN en co-culture (et de la recombinaison et réparation de l'ADN en monoculture) ; dans le cas d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, elle concerne la multiplication cellulaire en particulier (bourgeonnement des cellules, mitose). Pour l'adressage des protéines, l'activité majoritaire retrouvée chez *P. syringae* DSM 10604 en monoculture et pour laquelle le plus de protéines et peptides en co-culture sont retrouvés est le repliement des protéines, tandis que chez *A. oryzae* UMIP 1042.72, l'activité majoritaire et nouvelle en co-culture est une activité de protéolyse. Une activité de transcription est en outre uniquement retrouvée chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 en co-culture, impliquant entre autres la synthèse d'ARNt.

L'étude des protéines et peptides synthétisés par le couple *P. syringae* + *A. oryzae* en co-culture a pu montrer une activité différente entre les deux microorganismes, indiquant une réponse de stress, une synthèse de protéines accrue ainsi qu'un travail sur le repliement de ces dernières chez *P. syringae* DSM 10604, impliquant un certain nombre de protéines chaperons et de

chaperonines, tandis qu'en co-culture *A. oryzae* UMIP 1042.72 présente une respiration cellulaire accrue, mais aussi une multiplication des cellules, et une activité de protéolyse et de dégradation d'acides aminés.

4. Discussion

A travers les études de clusters, il a été possible de déterminer un potentiel de production de microorganismes chez *Streptomyces* sp. S0162, *C. cladosporioides* PNF6 et *P. syringae* DSM 10604. *Streptomyces* sp. S0162 a présenté le plus de clusters codant pour des métabolites secondaires, ce qui est attendu pour une souche appartenant à ce genre (Omura et al. 2001). Parmi les clusters identifiés se retrouvent des NRPS et des PKS (polykétides synthases), qui sont respectivement impliquées dans la synthèse de NRP et de polykétides, métabolites secondaires connus pour leurs activités antimicrobiennes (Esmael et al. 2018). En particulier, des clusters correspondent, parmi les pourcentages de similarité égaux à 100 % à des molécules, à la synthèse de molécules possédant des activités biologiques diverses. C'est le cas des PTM, connus comme étant des métabolites secondaires cryptiques notamment chez plusieurs espèces de *Streptomyces* dont *Streptomyces griseus* (Luo et al. 2013), et qui possèdent des activités cytotoxiques et antimicrobiennes (Hou et al. 2020). Les alkylrésorcinols sont quant à eux des métabolites secondaires possédant des activités antioxydantes, d'inhibition de croissance, notamment microbienne, et pouvant interagir avec les protéines ainsi que les membranes des microorganismes (Stasiuk, Kozubek 2010). Les deux lanthipeptides identifiés chez *Streptomyces* sp. S0162 sont impliqués dans la synthèse de mycélium (Ueda et al. 2002) et dans des possibles activités antibiotiques. La keywimysine, un autre RiPP, est un peptide lasso qui peut avoir une activité antimicrobienne (Maksimov, Link 2014). Le terpène isoréniératène est un caroténoïde qui a des propriétés antioxydantes (Krügel et al. 1999). L'ectoïne est une molécule avec des propriétés osmoprotectrices. La mélanine, également retrouvée ici, possède une activité protectrice contre de nombreux stress environnementaux, tels que la radiation, les températures extrêmes, la sécheresse, l'exposition aux métaux lourds ou encore le stress oxydatif (Li et al. 2018). La desferrioxamine B est quant à elle un sidérophore (Barona-Gómez et al. 2004). Plusieurs sidérophores se retrouvent dans les clusters identifiés, même pour des niveaux bas de similarité, comme la coelicheline (Barona-Gómez et al. 2004) ou un des clusters ne se retrouvant pas dans ceux connus chez *Streptomyces* (Annexe B, tableau B-1).

Dans les molécules décrites, des activités liées à la réponse à des stress (osmotique, de chaleur, d'oxydation) se retrouvent. En outre, des molécules liées à des interactions antagonistes possédant des activités antimicrobiennes ou antibiotiques sont également identifiées. Un grand nombre de ces clusters ne codent pas pour des molécules connues et décrites chez d'autres *Streptomyces*, mais appartiennent à des types similaires à ceux décrits, ce qui fait de

Streptomyces sp. S0162 un excellent candidat pour la recherche de métabolites secondaires grâce à la co-culture (Ibrahimi et al. 2020; Yu et al. 2019).

Dans le cas de *P. syringae* DSM 10604, la majorité des métabolites secondaires connus correspondant aux clusters identifiés sont des NRP ou des polykétides. La nunapeptine et la nunamycine, deux NRP sont identifiés avec certitude et présentent des activités antifongiques. Il a été montré que leur synthèse est induite par la présence de champignons consécutivement à la détection de molécules carbonées issues de ces derniers (Christiansen et al. 2020; Hennessy et al. 2017). Les rhizomides sont d'autres NRP connus pour leurs activités antitumorales et activités antimicrobiennes (Wang et al. 2018). La syringoline est un NRP facteur de virulence de *P. syringae* pour lequel une activité d'inhibition du protéasome des eucaryotes a été rapportée (Krahn et al. 2011). Enfin, les xénotérapeptides, également NRP, ont été retrouvés et synthétisés chez plusieurs bactéries, cependant leur activité n'est pas connue (Kegler et al. 2014; Liu et al. 2021). Parmi les autres NRP se retrouvent plusieurs métabolites secondaires possédant une activité antifongique. C'est par exemple le cas de la fragine qui peut inhiber la croissance des plantes (Tamura et al. 1967) et possède également une activité antifongique notamment contre *F. solani* (Jenul et al. 2018; Sieber et al. 2020). Un autre exemple est la pyoverdine, un sidérophore fluorescent produit par plusieurs espèces de *Pseudomonas* (Visca et al. 2007) dont *P. syringae* (Taguchi et al. 2010). Plusieurs clusters de *P. syringae* DSM 10604 ont été déterminés comme codant pour cette molécule, avec cependant une similarité faible (de 3 % à 12 %). Contrairement à *Streptomyces* sp. S0162, les clusters ne codant pas pour des métabolites secondaires connus sont peu nombreux. En effet, la souche de *P. syringae* DSM 10604 est bien décrite et étudiée. Ces clusters correspondent par exemple à la réponse à un stress osmotique pour le cluster NAGGN, impliqué dans la synthèse de N- γ -acetylglutaminyl glutamine 1-amide (Seip et al. 2011) ou à des molécules signal comme les hserlactones – homosérine lactones – impliquées dans le quorum sensing (Winson et al. 1995) et donc dans les interactions entre la bactérie et son environnement.

La mélanine chez *C. cladosporioides* est reconnue pour son rôle de protection contre les stress environnementaux. Ce métabolite secondaire est également lié à la persistance des spores et des sclérotas de champignon dans l'environnement ainsi que la virulence des phytopathogènes et la pénétration de leurs appressoria dans les plantes (Butler et al. 2005). D'autres métabolites secondaires peuvent être supposés sur la base des clusters reconnus chez *C. cladosporioides* PNF6 : la cercosporine est une toxine photosensibilisante retrouvée chez des champignons phytopathogènes (Daub, Ehrenshaft 2000). La monacoline K ou lovastatine est un

hypolipidémiant dont l'activité antifongique via la régulation de la synthèse d'ergostérol a été rapportée (Zhou et al. 2018). La néosartorine a elle été étudiée pour son activité antibactérienne à large spectre contre des bactéries à Gram positif (Ola et al. 2014). La majorité des clusters chez *C. cladosporioides* PNF6 codent cependant pour des métabolites secondaires inconnus. Néanmoins, beaucoup de clusters pourraient correspondre à la synthèse de NRP, dont des possible lipoprotéines ou des sidérophores. Aussi ses interactions avec d'autres microorganismes pourraient conduire à la synthèse de nouveaux composés qui n'ont pas encore été décrits.

Dans le cas d'*A. oryzae*, aucune recherche de clusters codant pour des métabolites secondaires n'a été réalisée. En effet, ce champignon étant couramment utilisé dans des processus de fermentation, ses productions métaboliques sont très bien décrites (Frisvad et al. 2018). Il a un profil de production similaire à celui d'*A. flavus*, mais ne produit pas de mycotoxines et n'est pas pathogène (Barbesgaard et al. 1992). Les métabolites sécrétés par *A. oryzae* sont donc similaires aux productions des espèces d'*Aspergillus* utilisées en biocontrôle décrites dans la synthèse bibliographique (Chapitre 1 partie 5.1.2). Parmi les métabolites secondaires présentant des activités antifongiques, l'asperfurane inhibe la synthèse de la chitine (Pfefferle et al. 1990) et le flufurane (Lee et al. 2016) possède également une activité antifongique (Evidente et al. 2009). L'acide heptelidique ou acide koningique est un sesquiterpène antibiotique dont la production a été également identifiée chez *A. oryzae* (Shinohara et al. 2019; Lee et al. 2016). Un inhibiteur des protéases à cystéine, la kojistatine (un NRP-polykétide), peut aussi être produit par *A. oryzae* (Sato et al. 1996) permettant donc une protection contre une protéolyse non maîtrisée ou extérieure, les protéases à cystéine se retrouvant dans une grande variété d'organismes dont des virus ou des bactéries (Turk et al. 2002). L'acide kojique, qui a été le premier métabolite secondaire identifié chez *A. oryzae* possède des activités antibiotiques et antioxydantes et est un inhibiteur de la tyrosinase, impliquée dans la synthèse de mélanine (Terabayashi et al. 2010; Cabanes et al. 1994). Les miyakamides, molécules antibiotiques, pourraient également être produites par des NRPS chez *A. oryzae* (Kjærboelling et al. 2020). Le séquençage et l'annotation des gènes d'*A. oryzae* par Machida et al. a en outre permis de mettre en avant la diversité et la capacité de production de ce champignon par rapport aux autres *Aspergilli*, comprenant un grand nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de toxines, des enzymes hydrolytiques, des cytochromes P450 ou encore des protéases, protéinases et peptidases (Machida et al. 2005). Aussi, *A. oryzae* présente, comme les autres microorganismes sélectionnés, un grand nombre de métabolites secondaires pouvant

être produits lors d'interactions avec d'autres microorganismes ou avec un environnement présentant des conditions de stress pour le champignon.

Les résultats des analyses de BGC ainsi que les apports bibliographiques dans la discussion confirment que les souches microbiennes sont des réservoirs de métabolites secondaires dont la synthèse est encore méconnue mais dont le potentiel est certain d'après les approches de bioinformatique. Cela s'observe avec *Streptomyces* sp. S0162 et *C. cladosporioides* PNF6 tout particulièrement.

Les analyses en Q-TOF ont pu mettre en évidence un certain nombre de familles et groupes se retrouvant dans les différentes mono- et co-cultures : les acides carboxyliques, peptides et autres dérivés d'acides aminés, les amides et les amines. Ce type de molécules se retrouve très souvent dans les productions de microorganismes, comme cela a pu être vu dans les paragraphes précédents ainsi que la synthèse bibliographique. En particulier, un certain nombre de métabolites bioactifs et notamment antifongiques possèdent des groupements acides carboxyliques, comme l'acide heptelidique produit par *A. oryzae* (Lee et al. 2016) ou l'acide phenazine-1-carboxylique produit par *P. aeruginosa* (Moussa et al. 2020). En outre, des métabolites antioxydants comme les vitamines sont aussi des acides carboxyliques. En ce qui concerne les peptides et autres dérivés, un très grand nombre de NRP ont été rapportés dans ce chapitre comme pouvant être synthétisés par *P. syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162 et *C. cladosporioides* PNF6, ainsi que par *A. oryzae* via la littérature, possédant également des activités antibiotiques ou antifongiques. Des RiPP ont également été décrits, comme les lanthipeptides. Les molécules contenant des amides et des amines ont également été décrites pour leur activité antimicrobienne, souvent en tant que dérivés d'autres molécules bioactives comme des amines ou amides d'alcaloïdes par exemple (Zhang et al. 2012).

Les carbamates sont des familles de molécules qui sont largement utilisées comme pesticides. Dans nos travaux, ils ne sont retrouvés que chez les bactéries en monoculture et les co-cultures ; ceux présents en co-culture ne le sont pas en monoculture pour *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *P. syringae* + *A. oryzae*, ce qui suppose une synthèse *de novo* de ces composés en présence d'*A. oryzae*. Les carbamates, bien que rares dans la nature, peuvent être produits par des microorganismes, par exemple chez une espèce de *Streptomyces* produisant un alcaloïde carbamate possédant une activité antibactérienne (Fang et al. 2021). Certains groupes de molécules ne se retrouvent que dans les surnageants de co-cultures, comme un ester chez *P. syringae* + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, et des alkyles, hydrazines et azoles chez *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. Les esters sont eux-mêmes des dérivés d'acide

carboxylique. Un grand nombre de molécules antifongiques possèdent une fonction ester (Xu et al. 2022; Pinto et al. 2017), ou leur estérification est étudiée pour une amélioration de leur solubilité (Howarth et al. 1975). Les fonctions alkyles se retrouvent également dans plusieurs composés antifongiques, avec la longueur de la chaîne alkyle ayant une influence sur l'activité observée (Suárez-Quiroz et al. 2013; Li et al. 2005). Les hydrazines et hydrazides se retrouvent assez rarement dans la nature, mais peuvent tout de même être produits par des microorganismes (Le Goff, Ouazzani 2014) dont des bactéries comme *Streptomyces* (Matsuda et al. 2018). Plusieurs molécules contenant des groupes hydrazines ont montré une très bonne activité antifongique (Li et al. 2016; Lv et al. 2020; Zhang et al. 2021). Enfin, les azoles se retrouvent classiquement dans les fongicides chimiques, mais sont également synthétisés par des microorganismes (Fontana 2010). Leur activité antifongique est bien décrite et une synergie avec des produits naturels tels que les huiles essentielles a été rapportée (Tullio et al. 2019; J. Wang et al. 2021).

L'étude des principaux métabolites secondaires détectés en Q-TOF dans les surnageants de mono- et de co-cultures s'est principalement intéressée à la détermination de la formule brute de ces composés, et l'identification de ses composés dans les bases de données de molécules s'est limitée à 10 composés par formule brute. Très peu d'identifications ont pu être réalisées sur la base des formules brutes, malgré l'enrichissement des bases de données par les métabolites secondaires discutés précédemment. Plusieurs métabolites secondaires sont uniquement détectés en co-culture, tels que l'auxine, chez *P. syringae* + *A. oryzae*, le sidérophore desferrioxamine E chez *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, et la vitamine B3 ainsi que la bénarthine chez *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. La production d'auxine a déjà été rapportée chez des espèces de *Pseudomonas*, et notamment chez *P. syringae* (Glickmann et al. 1998). En plus d'être une hormone promouvant la croissance des plantes, l'auxine a une activité antimicrobienne et notamment antifongique contre des phytopathogènes (Khare, Arora 2010). La desferrioxamine E est un acide hydroxamique et sidérophore tout comme la desferrioxamine B dont la production par *Streptomyces* sp. S0162 avait été prédite grâce à la détermination de clusters de gènes synthétisant des métabolites secondaires. Aussi, il est possible que le cluster de gènes identifié comme codant pour un sidérophore 100 % similaire à la desferrioxamine B ait été impliqué dans la synthèse de la desferrioxamine E. Ce sidérophore a déjà été identifié dans une autre co-culture de *Streptomyces lunalinharesii* et *Rhizoctonia solani* (Maimone et al. 2021) où la croissance du champignon *R. solani* a été inhibée par *S. lunalinharesii*. En outre, la desferrioxamine E retrouvée en co-culture a été produite par *S. lunalinharesii*. Les

desferrioxamines, principaux sidérophores produits par *Streptomyces*, ont été décrites pour leur activité antifongique (Jarmusch et al. 2021). La vitamine B3 est un composé antioxydant, également reconnu pour son aptitude à inhiber certaines activités microbiennes comme la production de métabolites notamment (Jin et al. 2022). La vitamine B5 a aussi été identifiée chez *Streptomyces* sp. S0162 et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, cependant non détectée chez *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* supposant une inhibition de sa production ou sa dégradation par le champignon. Enfin, la bénarthine est un métabolite secondaire connu pour son activité antibactérienne, par l'inhibition de la pyroglutamyl peptidase (Aoyagi et al. 1992). Aussi, les métabolites identifiés ainsi que les familles de molécules uniquement retrouvées dans les co-cultures possèdent des activités biologiques, supposant un certain type d'interaction, qui semble antagoniste entre la bactérie et le champignon, avec des métabolites liés à des activités antifongiques ou antioxydantes, ou encore à une compétition entre les deux partenaires de culture.

Les surnageants de *P. syringae* DSM 10604, de *A. oryzae* UMIP 1042.72 et de leur co-culture ont fait l'objet d'analyses supplémentaires, pour la détermination des protéines et peptides sécrétés en co-culture mais également lors de la monoculture de la bactérie et du champignon. A travers une étude des voies fonctionnelles auxquelles les protéines et peptides appartenaient, il a été possible de déterminer qu'en monoculture et en co-culture, les comportements d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 et *P. syringae* DSM 10604 sont très différents. En monoculture, les deux microorganismes présentent des voies fonctionnelles orientées vers le métabolisme des composés carbonés et la synthèse protéique. En co-culture, les profils observés sont différents. La co-culture de *P. syringae* DSM 10604 et *A. oryzae* UMIP 1042.72 induit par exemple l'expression par *P. syringae* DSM 10604 de protéines liées à la réponse au stress. En particulier, l'alkyl hydroxyde réductase sert de protection contre le stress oxydatif (Panmanee, Hassett 2009). Un ensemble de protéines chaperons retrouvées également en co-culture, les protéines GrpE et DnaK – qui sont habituellement en association avec DnaJ, non identifiée dans cette étude – sont impliquées dans la réponse aux stress, notamment osmotique et lié aux températures élevées ; elles régulent également la synthèse de lipopeptides chez *P. putida* (Dubern et al. 2005) et de sidérophores chez *P. fluorescens* (Song et al. 2014). Un certain nombre de protéases sont également synthétisées par *P. syringae* DSM 10604 en co-culture, dont des protéases caséinolytiques ; la protéase caséinolytique ClpP chez *P. fluorescens* régule la synthèse des lipopeptides (de Bruijn, Raaijmakers 2009). Il est possible qu'en plus d'un rôle de régulation de stress, les nombreuses protéines produites en co-culture soient liées à la

synthèse de lipopeptides, pouvant ainsi expliquer la proportion importante de peptides et dérivés synthétisés *de novo* dans la co-culture (Figure 40B). La peptidyl-prolyl cis-trans isomérase, une autre protéine chaperon uniquement retrouvée dans la co-culture, a été rapportée comme éliciteur de défense des plantes contre des pathogènes fongiques (Shumilina et al. 2006; Voinova et al. 2021). La réponse d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 à la co-culture avec *P. syringae* DSM 10604 se traduit chez le champignon par la production de protéines liées à la synthèse d'ADN et la multiplication cellulaire. Les seules protéines liées à une réponse de stress qui sont produites sont des HSP et des chaperonines, aussi retrouvées en monoculture. Il est intéressant de noter que chez les deux microorganismes, des protéines liées à l'organisation de la paroi cellulaire (des mannoprotéines chez *A. oryzae* UMIP 1042.72) ou de la membrane plasmique (de possibles lipoprotéines chez *P. syringae* DSM 10604) sont retrouvées, supposant une lyse cellulaire de chaque partenaire. Chez les deux microorganismes en co-culture, l'apparition de protéines non caractérisées ou ayant une activité inconnue est observée, supposant que l'expression de gènes restés silencieux en monoculture serait induite par la mise en présence et le contact de *P. syringae* DSM 10604 et d'*A. oryzae* UMIP 1042.72. Globalement, les comportements observés chez les deux microorganismes mènent à l'hypothèse suivante : en co-culture, dans les conditions choisies, *A. oryzae* UMIP 1042.72 prend le dessus sur *P. syringae* DSM 10604, présentant une meilleure croissance et une production en outre de molécules pouvant dégrader les acides aminés et les protéines. *P. syringae* DSM 10604 montre une synthèse protéique importante, un métabolisme tourné vers les lipides et acides gras, et une réponse de stress importante, dont les composants pourraient être impliqués dans la régulation de la synthèse de lipopeptides à possible activité antifongique. Les deux microorganismes produiraient des métabolites pouvant dégrader la paroi cellulaire et/ou la membrane plasmique, expliquant les mannoprotéines et lipoprotéines qui sont retrouvées en co-culture. Cette hypothèse se vérifie par le fait que le profil de production de métabolites par *P. syringae* + *A. oryzae* ressemble à celui d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, et que la majorité des molécules trouvées en co-culture sont soit aussi présentes chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 soit synthétisées *de novo* en co-culture.

5. Conclusion

Les différentes analyses réalisées dans ce chapitre sur les couples bactérie-champignon les plus performants déterminés dans le chapitre de criblage ont apporté un grand nombre d'informations : tout d'abord, le potentiel de production de métabolites secondaires des souches considérées. Les analyses en Q-TOF ont ensuite permis de déterminer qu'une grande partie des métabolites considérés en co-culture étaient synthétisés *de novo*, et que la majorité des métabolites sécrétés étaient des acides carboxyliques, des dérivés de peptides ou des molécules inconnues, dont la formule brute ne correspondait à aucune référence dans les bases de données étudiées. C'est particulièrement le cas pour les souches environnementales *Streptomyces* sp S0162 et *C. cladosporioides* PNF6 qui, en considérant également leur potentiel de production déterminé par étude de leurs BCG, apparaissent comme prometteuses dans le cadre de la poursuite de ces études. En outre, pour chaque co-culture, certaines familles ou fonctions n'ont pas été détectées en monoculture.

En particulier, plusieurs molécules connues pour leur activité antifongique ou antimicrobienne ont été uniquement identifiées en co-culture sur la base de leur formule brute : de l'auxine chez *P. syringae* + *A. oryzae*, un sidérophore, la desferrioxamine E, chez *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* (dont la production a pu être prédite par analyse de clusters) et la niacine et la bénarthine chez *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. La synthèse *de novo* de tels composés biologiquement actifs a été possible grâce aux interactions entre les différents microorganismes impliqués en co-culture. La nature de leurs activités – antioxydantes, antifongiques ou antibactériennes – implique des interactions antagonistes générées en co-culture.

Enfin, l'étude protéomique et peptidique d'une seule co-culture, *P. syringae* + *A. oryzae*, a permis de comprendre un peu mieux les interactions entre les deux microorganismes ; les voies fonctionnelles auxquelles correspondent les différentes protéines et peptides uniquement synthétisés et sécrétés en co-culture supposent une interaction antagoniste, où *A. oryzae* UMIP 1042.72 a pris le dessus, mais également où *P. syringae* DSM 10604 et sa machinerie cellulaire sont encore actifs.

Les résultats montrent pour toutes les co-cultures une activation possible de clusters de gènes silencieux, avec la présence de métabolites inconnus en Q-TOF et de protéines non caractérisées en protéomique.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion générale

Le biocontrôle se présente depuis plusieurs années, et ce de plus en plus, comme une solution de première ligne pour remplacer les fongicides de synthèse : il offre en effet des moyens de lutte possédant une bonne efficacité sans les inconvénients retrouvés chez les fongicides de synthèse comme la résistance, la toxicité et la rémanence dans l'environnement. De plus, dans la lutte contre *F. oxysporum* et *F. graminearum*, deux phytopathogènes majeurs, les solutions de biocontrôle demeurent un avantage crucial là où la plupart des alternatives restent les bonnes pratiques agricoles plutôt que des fongicides de synthèse, dont l'efficacité est de moins en moins importante.

En particulier, les métabolites produits par les microorganismes suscitent un intérêt toujours grandissant, de par leurs applications nombreuses. Leur utilisation dans le biocontrôle afin de lutter contre les phytopathogènes fongiques est de plus en plus développée, notamment grâce à la découverte de nouvelles souches dans l'environnement et de nouvelles molécules bioactives néfastes pour les pathogènes mais sans effet voire ayant des effets bénéfiques pour les plantes.

Ici, l'intérêt s'est porté sur la co-culture de bactéries et de champignons dans l'objectif de trouver de nouvelles activités antifongiques contre une souche de *F. oxysporum* et de levure (*S. cerevisiae*). La première étape de cette étude a porté sur le choix des microorganismes qui seraient mis en co-culture, ceux-ci sélectionnés sur la base d'un état de l'art sur ce qui est utilisé en biocontrôle, notamment contre des espèces pathogènes de *Fusarium*. Cette sélection a mené au choix raisonné de cinq souches bactériennes (*Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Pseudomonas syringae* DSM 10604, *Dietzia* sp. DM01, *Streptomyces coelicolor* M145 et *Streptomyces* sp. S0162) et cinq souches fongiques (*Pseudozyma aphidis* DSM 1247, *Trichoderma harzianum* Rifai MUCL 29707, *Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72, *Cladosporium cladosporioides* PNF 6 et *Fusarium oxysporum* BRCR7), ainsi qu'au choix de trois conditions de milieux dans lesquels tout ou partie des microorganismes pouvaient se développer, deux milieux riches (NB et LB) et un milieu minimum (GMM) afin d'induire des comportements différentiels de production.

Les co-cultures en microbioréacteur lors de la première phase de criblage se sont révélées plus actives que les monocultures contre les cibles choisies ; treize co-cultures sur vingt-cinq ont montré une activité contre au moins une des deux cibles. Après la deuxième phase de criblage, trois couples particulièrement performants ont été retenus : *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. En particulier, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* a montré une activité synergique contre *F. oxysporum*,

et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* additive. Cette synergie et cette additivité n'ont pas été retrouvées après modification de l'agitation de la culture, dénotant l'influence des conditions de culture sur la production de métabolites secondaires par les différents microorganismes impliqués. De plus, l'activité de *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* en milieu liquide contre *F. oxysporum* est stable dans le temps, jusqu'à cinq jours. Dans le cas de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, une activité d'inhibition totale est observée à deux jours en milieu liquide mais n'est plus détectée après cinq jours. L'activité antifongique de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* est passagère, cependant très intense (jusqu'à 100 % d'inhibition observée à deux jours), suggérant une dégradation des molécules causant cette activité. Il est également à noter que cette activité est retrouvée, de façon identique chez *Streptomyces* sp. S0162, supposant une activité inhibitrice issue de la bactérie. De même, *A. oryzae* UMIP 1042.72 présente une activité antifongique très intense, à deux et cinq jours, cependant *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* reste plus actif après cinq jours. La co-culture *P. syringae* + *A. oryzae*, malgré une activité très importante, demeure moins active que *A. oryzae* UMIP 1042.72 en monoculture. La cytométrie en flux a apporté l'information, pour *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, qu'une partie du mécanisme d'activité antifongique est liée à la fragilisation de la membrane de *S. cerevisiae* possiblement par la formation de pores.

L'analyse des clusters de gènes codant pour des métabolites secondaires chez *Streptomyces* sp. S0162, *C. cladosporioides* PNF6 et *P. syringae* DSM 10604 a mis en évidence la production potentielle d'un grand nombre de métabolites possédant des propriétés de protection contre des stress mais aussi des activités antifongiques. En outre, et cela est particulièrement vrai pour *Streptomyces* sp. S0162 et *C. cladosporioides*, un grand nombre de ces clusters codent pour des molécules non connues, révélant un potentiel de production de métabolites d'intérêt nouveaux très importants.

Via une étude des métabolites produits par les monocultures et les co-cultures sélectionnées après l'étape de criblage, il a été possible d'identifier, sur la base de leur formule brute, plusieurs métabolites secondaires produits uniquement en co-culture : l'auxine, par *P. syringae* + *A. oryzae*, le sidérophore desferrioxamine E par *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et dont la production avait été prédite par l'étude des clusters biosynthétiques, et la niacine et la bénarthine par *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. Aussi l'étude protéomique et peptidomique de *P. syringae* + *A. oryzae* a montré un comportement différentiel de *P. syringae* DSM 10604 et d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, avec l'un présentant une réponse de stress et l'autre un focus sur le développement et la dégradation de protéines. Les résultats de métabolomique et protéomique

laissent supposer que *P. syringae* DSM 10604 a synthétisé des lipopeptides en présence d'*A. oryzae* UMIP 1042.72, qui en retour a produit des protéases et protéines dégradant les acides aminés.

Globalement, les co-cultures impliquant *A. oryzae* UMIP 1042.72 ont montré des activités sur boîte et en milieu liquide similaires à celles d'*A. oryzae* seul. De plus, cette activité est réduite en présence de *P. syringae* DSM 10604 et généralement améliorée en présence de *Streptomyces* sp. S0162. Cette dernière observation peut être expliquée pour *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, couple pour lequel le développement de *Streptomyces* sp. S0162 est entravé, tandis qu'*A. oryzae* UMIP 1042.72 se développe relativement normalement. En outre, la plupart des métabolites produits dans ces co-cultures sont également produits par *A. oryzae* UMIP 1042.72 seul. Le type d'interaction ainsi recréé dans ces co-cultures est une interaction antagoniste, où le développement d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 est peu impacté (matière sèche de la co-culture légèrement inférieure à celle de la monoculture seule) mais le développement de la bactérie fortement inhibé. Les bactéries produisent tout de même des métabolites secondaires, comme la desferrioxamine E ou l'auxine en réponse à la présence d'*A. oryzae* UMIP 1042.72. *P. syringae* DSM 10604 présente une réponse suggérant la mise en place d'une défense contre *A. oryzae* UMIP 1042.72. Dans le cas de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, c'est la bactérie qui prend le dessus, et le développement de *C. cladosporioides* PNF6 semble presque complètement inhibé. Cette co-culture ne produit pas les métabolites secondaires produits par le champignon seul. Cependant, un grand nombre de métabolites sont produits *de novo* dans la co-culture, suggérant une influence de la présence de *C. cladosporioides* PNF6 dans la réponse métabolique de *Streptomyces* sp. S0162. En outre, la co-culture de *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* résulte en un effet synergique par rapport aux monocultures. L'effet observé est fongistatique et passager, témoignant de la production par *Streptomyces* sp. S0162 d'une ou de plusieurs molécules inhibant la croissance de façon très marquée mais se faisant dégrader soit par *F. oxysporum* soit par les conditions extérieures (température, agitation, ...).

2. Perspectives

Ce projet a ainsi permis d'étudier de multiples interactions entre des bactéries et des champignons, dans l'optique de la production de molécules antifongiques. Une perspective immédiate serait l'étude des productions protéiques et peptidiques des deux autres couples les plus performants *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*, afin de décrypter les interactions mises en place, bien que celles-ci soient clairement antagonistes là encore. D'autres interactions n'ont pas conduit à la production d'activité antifongique et n'ont pas non plus montré une quelconque inhibition de croissance chez les microorganismes impliqués : c'est le cas de *Dietzia* sp. DM01 et *T. harzianum* Rifai MUCL 29707, dont l'interaction semblait relativement neutre voire peut-être bénéfique.

En plus de ces études protéomiques supplémentaires, il serait intéressant d'étudier l'activité des couples sélectionnés contre d'autres champignons pathogènes, comme par exemple *Zymoseptoria tritici*, un autre phytopathogène ayant des conséquences économiques et écologiques importantes sur le blé. Ceci afin de déterminer si l'activité antifongique observée est à large spectre ; l'inhibition d'autres champignons voire de bactéries potentiellement bénéfiques aux plantes serait également intéressante à étudier, afin de déterminer si les molécules produites seraient néfastes à l'environnement immédiat de la plante que l'on désire protéger.

L'objectif de ce projet était de produire des cocktails de molécules actives contre les champignons, notamment *Fusarium*. Cet objectif a été atteint. Si l'un des apports majeurs de cette thèse est le fait que beaucoup de molécules n'ont été retrouvées qu'en co-culture – dont certaines de celles identifiées – peu de molécules ont été identifiées, et celles qui le sont l'ont été sur la base de leur formule brute. Aussi, un travail supplémentaire en HPLC et en RMN serait intéressant à réaliser, d'une part pour étudier les productions des co-cultures et fractionner les cocktails de molécules, et d'autre part pour élucider la structure des métabolites qui seraient les plus actifs.

Il serait également intéressant de travailler à l'optimisation de l'activité antifongique de ces co-culture. Une première possibilité d'optimisation serait l'étude de l'inoculation des microorganismes. A une inoculation égale (5.10^5 spores et 5.10^5 cellules) et simultanée, c'est-à-dire l'option choisie dans cette thèse, un certain type de développement a été observé. Cependant, comme cela a été vu dans la synthèse bibliographique (Chapitre 1 partie 4.2), l'inoculation en co-culture peut être différée dans le temps ou dans les proportions

d'inoculation, et cela influence le comportement des microorganismes ainsi mis en présence l'un de l'autre. Il serait par exemple intéressant d'étudier le comportement en co-culture d'*A. oryzae* UMIP 1042.72 inoculé en proportion inférieure à *P. syringae* DSM 10604 ou *Streptomyces* sp. S0162 ou bien après ces bactéries. Une autre voie d'optimisation pourrait être le travail sur les conditions de culture. Comme il a pu être observé, la montée en échelle présentée dans ce travail, bien que minime, a induit des différences d'activité chez les microorganismes – par exemple aucune activité observée chez *A. oryzae* UMIP 1042.72 en microbioréacteur, mais il présente l'une des meilleures activités en fioles. En outre, la modification de la taille des fioles et donc de l'agitation des cultures a également causé une modification des profils d'activité. Enfin, il a pu être observé que le milieu riche NB ou LB causait une activité antifongique différentielle chez les monocultures et co-cultures. Aussi, plusieurs paramètres peuvent être influencés afin d'optimiser cette production : avec un milieu fixe où des activités antifongiques intenses ont été observées, tel que le LB, il est possible de travailler sur le volume de culture, l'agitation ou encore la température afin de déterminer la meilleure activité antifongique pour un couple donné.

En se projetant plus loin avec les cocktails de molécules produits par les co-cultures les plus performantes, l'objectif final étant un produit de biocontrôle, une étude de toxicité des cocktails serait également à envisager. Leurs effets sur les plantes, sur d'autres microorganismes, sur des invertébrés ou encore sur des mammifères seraient donc à étudier. Leur éventuelle rémanence dans l'environnement également, ainsi que leur stabilité en tant que produit de biocontrôle. En effet, il a déjà été observé qu'une co-culture (*Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*) présente une activité inhibitrice très intense mais transitoire (de même pour *Streptomyces* sp. S0162), aussi une possible stabilisation de ces molécules est envisageable, par formulation du produit ou, si les molécules actives sont connues, par synthèse et fonctionnalisation chimique, ceci dans le but de garantir une activité *in planta* ou au champ d'une durée déterminée et désirée pour son action contre des phytopathogènes fongiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDELWAHAB, Miada F., KURTÁN, Tibor, MÁNDI, Attila, MÜLLER, Werner E. G., FOUAD, Mostafa A., KAMEL, Mohamed S., LIU, Zhen, EBRAHIM, Weaam, DALETOS, Georgios et PROKSCH, Peter, 2018. Induced secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* through bacterial co-culture and OSMAC approaches. *Tetrahedron Letters*. 4 juillet 2018. Vol. 59, n° 27, pp. 2647-2652. DOI 10.1016/j.tetlet.2018.05.067.
- ABRIOUEL, Hikmate, FRANZ, Charles M.A.P., OMAR, Nabil Ben et GÁLVEZ, Antonio, 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1 janvier 2011. Vol. 35, n° 1, pp. 201-232. DOI 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- AIRE, T. A., 2005. Short-term effects of carbendazim on the gross and microscopic features of the testes of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Anatomy and Embryology*. août 2005. Vol. 210, n° 1, pp. 43-49. DOI 10.1007/s00429-005-0001-0.
- AKONE, Sergi Herve, MÁNDI, Attila, KURTÁN, Tibor, HARTMANN, Rudolf, LIN, Wenhan, DALETOS, Georgios et PROKSCH, Peter, 2016. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal–bacterial co-culture and epigenetic modification. *Tetrahedron*. 13 octobre 2016. Vol. 72, n° 41, pp. 6340-6347. DOI 10.1016/j.tet.2016.08.022.
- AL-ASKAR, A.A. et RASHAD, Y.M., 2010. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Biocontrol Agent against Common Bean Fusarium Root Rot Disease. *Plant pathology journal*. 2010. Vol. 9, n° 1, pp. 31-38. DOI 10.3923/ppj.2010.31.38.
- ALDINARY, Ahmed M., MORSY ABDELAZIZ, Amer, FARRAG, Ayman A. et ATTIA, Mohamed S., 2021. Biocontrol of tomato Fusarium wilt disease by a new *Moringa* endophytic *Aspergillus* isolates. *Materials Today: Proceedings*. 8 avril 2021. DOI 10.1016/j.matpr.2021.03.423.
- ALSHANNAQ, Ahmad F., GIBBONS, John G., LEE, Mi-Kyung, HAN, Kap-Hoon, HONG, Seung-Beom et YU, Jae-Hyuk, 2018. Controlling aflatoxin contamination and propagation of *Aspergillus flavus* by a soy-fermenting *Aspergillus oryzae* strain. *Scientific Reports*. 15 novembre 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 16871. DOI 10.1038/s41598-018-35246-1.
- ANDERSON, A S et WELLINGTON, E MYR 2001, 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. Vol. 51, n° 3, pp. 797-814. DOI 10.1099/00207713-51-3-797.
- ANDRADE, Thayres S., HENRIQUES, Jorge F., ALMEIDA, Ana Rita, MACHADO, Ana Luísa, KOBAYASHI, Olga, GIANG, Pham Thai, SOARES, Amadeu M. V. M. et DOMINGUES, Inês, 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*. janvier 2016. Vol. 170, pp. 390-399. DOI 10.1016/j.aquatox.2015.11.017.
- ANDREWS, Simon, 2010. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. 2010.
- ANITHA, A. et RABEETH, M., 2010. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. *African Journal of Plant Science*. 31 mars 2010. DOI 10.5897/AJPS.9000058.

ANSES. E-Phy : Produits phytopharmaceutiques enregistrés pour lutter contre la fusariose. Disponible à l'adresse : <https://ephy.anses.fr>

AOKI, Takayuki, O'DONNELL, Kerry et GEISER, David M., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*. 1 mai 2014. Vol. 80, n° 3, pp. 189-201. DOI 10.1007/s10327-014-0509-3.

AOYAGI, T., HATSU, M., KOJIMA, F., HAYASHI, C., HAMADA, M. et TAKEUCHI, T., 1992. Benarthin: a new inhibitor of pyroglutamyl peptidase. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*. juillet 1992. Vol. 45, n° 7, pp. 1079-1083. DOI 10.7164/antibiotics.45.1079.

ARIE, Tsutomu, 2019. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*. 25 juillet 2019. Vol. 44, n° 4, pp. 275-281. DOI 10.1584/jpestics.J19-03.

ARNOLD, Julia T., KAUFMAN, David G., SEPPÄLÄ, Markku et LESSEY, Bruce A., 2001. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Human Reproduction*. 1 mai 2001. Vol. 16, n° 5, pp. 836-845. DOI 10.1093/humrep/16.5.836.

ARORA, Divya, GUPTA, Prasoon, JAGLAN, Sundeep, ROULLIER, Catherine, GROVEL, Olivier et BERTRAND, Samuel, 2020. Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: Current status and outlook. *Biotechnology Advances*. 1 mai 2020. Vol. 40, pp. 107521. DOI 10.1016/j.biotechadv.2020.107521.

ARORA, Naveen Kumar, KHARE, Ekta, OH, Ji Hoon, KANG, Sun Chul et MAHESHWARI, Dinesh K., 2008. Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1 avril 2008. Vol. 24, n° 4, pp. 581-585. DOI 10.1007/s11274-007-9505-5.

ARVALIS. Fusarioses de l'épi - Maladie sur Blé tendre, blé dur, triticale, ARVALIS Résultats 2013. *Les Fiches Accidents - ARVALIS-infos.fr*.

ASADHI, Sujitha, BHASKARA REDDY, B.V., SIVAPRASAD, Y., PRATHYUSHA, M., MURALI KRISHNA, T., VIJAY KRISHNA KUMAR, K. et RAJA REDDY, K., 2013. Characterisation, genetic diversity and antagonistic potential of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* isolates in groundnut-based cropping systems of Andhra Pradesh, India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 1 octobre 2013. Vol. 46, n° 16, pp. 1966-1977. DOI 10.1080/03235408.2013.782223.

ASARI, Shashidar, MATZÉN, Staffan, PETERSEN, Mikael Agerlin, BEJAI, Sarosh et MEIJER, Johan, 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*. 1 juin 2016. Vol. 92, n° 6, pp. fiw070. DOI 10.1093/femsec/fiw070.

ASSIGBETSE, K. B., FERNANDEZ, D., DUBOIS, M. P. et GEIGER, J. P., 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*. 1994. Vol. 84, n° 6, pp. 622-626.

ATALLA, Sherien M. M., ABDEL-KADER, Mokhtar M., EL-GAMAL, Nadia G. et EL-MOUGY, Nehal S., 2020. Using maize wastes, fermented by co-cultures of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens*, as grain dressing against m maize diseases under

field conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 1 avril 2020. Vol. 30, n° 1, pp. 37. DOI 10.1186/s41938-020-00236-x.

AVIS, T. J., CARON, S. J., BOEKHOUT, T., HAMELIN, R. C. et BÉLANGER, R. R., 2001. Molecular and Physiological Analysis of the Powdery Mildew Antagonist *Pseudozyma flocculosa* and Related Fungi. *Phytopathology*®. 1 mars 2001. Vol. 91, n° 3, pp. 249-254. DOI 10.1094/PHYTO.2001.91.3.249.

AWASTHI, N., SINGH, A. K., JAIN, R. K., KHANGAROT, B. S. et KUMAR, A., 2003. Degradation and detoxification of endosulfan isomers by a defined co-culture of two *Bacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 août 2003. Vol. 62, n° 2, pp. 279-283. DOI 10.1007/s00253-003-1241-7.

AZIZ, A, POINSSOT, B, DAIRE, X, ADRIAN, M, BÉZIER, Bézier, LAMBERT, B, JOUBERT, JM et PUGIN, Alain, 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. décembre 2003. Vol. 16, n° 12. DOI 10.1094/MPMI.2003.16.12.1118.

AZZOLLINI, Antonio, BOGGIA, Lorenzo, BOCCARD, Julien, SGORBINI, Barbara, LECOULTRE, Nicole, ALLARD, Pierre-Marie, RUBIOLO, Patrizia, RUDAZ, Serge, GINDRO, Katia, BICCHI, Carlo et WOLFENDER, Jean-Luc, 2018. Dynamics of Metabolite Induction in Fungal Co-cultures by Metabolomics at Both Volatile and Non-volatile Levels. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9, pp. 72. DOI 10.3389/fmicb.2018.00072.

BACKMAN, Paul A. et SIKORA, Richard A., 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*. 1 juillet 2008. Vol. 46, n° 1, pp. 1-3. DOI 10.1016/j.biocontrol.2008.03.009.

BAĆMAGA, Małgorzata, WYSZKOWSKA, Jadwiga et KUCHARSKI, Jan, 2019. The biochemical activity of soil contaminated with fungicides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 3 avril 2019. Vol. 54, n° 4, pp. 252-262. DOI 10.1080/03601234.2018.1553908.

BAGINSKI, M. et CZUB, J., 2009. Amphotericin B and Its New Derivatives - Mode of Action. *Current Drug Metabolism*. 1 juin 2009. Vol. 10, n° 5, pp. 459-469. DOI 10.2174/138920009788898019.

BAILEY, B. A., BAE, H., STREM, M. D., CROZIER, J., THOMAS, S. E., SAMUELS, G. J., VINYARD, B. T. et HOLMES, K. A., 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 1 juillet 2008. Vol. 46, n° 1, pp. 24-35. DOI 10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.

BALAGADDÉ, Frederick K, SONG, Hao, OZAKI, Jun, COLLINS, Cynthia H, BARNET, Matthew, ARNOLD, Frances H, QUAKE, Stephen R et YOU, Lingchong, 2008. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Molecular Systems Biology*. 15 avril 2008. Vol. 4, pp. 187. DOI 10.1038/msb.2008.24.

BANKEVICH, Anton, NURK, Sergey, ANTIPOV, Dmitry, GUREVICH, Alexey A., DVORKIN, Mikhail, KULIKOV, Alexander S., LESIN, Valery M., NIKOLENKO, Sergey I., PHAM, Son, PRJIBELSKI, Andrey D., PYSHKIN, Alexey V., SIROTKIN, Alexander V., VYAAHI, Nikolay, TESLER, Glenn, ALEKSEYEV, Max A. et PEVZNER, Pavel A., 2012.

SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. mai 2012. Vol. 19, n° 5, pp. 455-477. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.

BARBESGAARD, Peder, HELDT-HANSEN, Hans Peter et DIDERICHSEN, Børge, 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 février 1992. Vol. 36, n° 5, pp. 569-572. DOI 10.1007/BF00183230.

BARÉ, Julie, SABBE, Koen, HUWS, Sharon, VERCAUTEREN, Dries, BRAECKMANS, Kevin, VAN GREMBERGHE, Ineke, FAVOREEL, Herman et HOUF, Kurt, 2010. Influence of temperature, oxygen and bacterial strain identity on the association of *Campylobacter jejuni* with *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Ecology*. 1 novembre 2010. Vol. 74, n° 2, pp. 371-381. DOI 10.1111/j.1574-6941.2010.00955.x.

BARONA-GÓMEZ, Francisco, WONG, Ursula, GIANNAKOPOULOS, Anastassios E., DERRICK, Peter J. et CHALLIS, Gregory L., 2004. Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of the American Chemical Society*. 1 décembre 2004. Vol. 126, n° 50, pp. 16282-16283. DOI 10.1021/ja045774k.

BARRATT, R. W., JOHNSON, G. B. et OGATA, W. N., 1965. Wild-Type and Mutant Stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. juillet 1965. Vol. 52, n° 1, pp. 233-246.

BEN SALAH-ABBÈS, Jalila, MANNAI, Marwa, BELGACEM, Hela, ZINEDINE, Abdella et ABBÈS, Samir, 2021. Efficacy of lactic acid bacteria supplementation against *Fusarium graminearum* growth in vitro and inhibition of Zearalenone causing inflammation and oxidative stress in vivo. *Toxicon*. 30 octobre 2021. Vol. 202, pp. 115-122. DOI 10.1016/j.toxicon.2021.09.010.

BENHAMOU, Nicole, REY, Patrice, CHÉRIF, Mohamed, HOCKENHULL, John et TIRILLY, Yves, 1997. Treatment with the Mycoparasite *Pythium oligandrum* Triggers Induction of Defense-Related Reactions in Tomato Roots When Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*®. janvier 1997. Vol. 87, n° 1, pp. 108-122. DOI 10.1094/PHYTO.1997.87.1.108.

BENÍTEZ, Tahia, RINCÓN, Ana M., LIMÓN, M. Carmen et CODÓN, Antonio C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*. décembre 2004. Vol. 7, n° 4, pp. 249-260.

BENOIT, Isabelle, VAN DEN ESKER, Marielle H., PATYSHAKULIYEVA, Aleksandrina, MATTERN, Derek J., BLEI, Felix, ZHOU, Miaomiao, DIJKSTERHUIS, Jan, BRAKHAGE, Axel A., KUIPERS, Oscar P., DE VRIES, Ronald P. et KOVÁCS, Ákos T., 2015. *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environmental Microbiology*. juin 2015. Vol. 17, n° 6, pp. 2099-2113. DOI 10.1111/1462-2920.12564.

BENSCH, K., BRAUN, U., GROENEWALD, J. Z. et CROUS, P. W., 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*. 1 juin 2012. Vol. 72, pp. 1-401. DOI 10.3114/sim0003.

BERNARD, Edward, LARKIN, Robert P., TAVANTZIS, Stellos, ERICH, M. Susan, ALYOKHIN, Andrei, SEWELL, Gary, LANNAN, Andrew et GROSS, Serena D., 2012. Compost, rapeseed rotation, and biocontrol agents significantly impact soil microbial

communities in organic and conventional potato production systems. *Applied Soil Ecology*. 1 janvier 2012. Vol. 52, pp. 29-41. DOI 10.1016/j.apsoil.2011.10.002.

BERTI, Andrew D., GREVE, Nathan J., CHRISTENSEN, Quin H. et THOMAS, Michael G., 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Journal of Bacteriology*. septembre 2007. Vol. 189, n° 17, pp. 6312-6323. DOI 10.1128/JB.00725-07.

BERTRAND, Samuel, AZZOLLINI, Antonio, SCHUMPP, Olivier, BOHNI, Nadine, SCHRENZEL, Jacques, MONOD, Michel, GINDRO, Katia et WOLFENDER, Jean-Luc, 2014. Multi-well fungal co-culture for de novo metabolite-induction in time-series studies based on untargeted metabolomics. *Molecular bioSystems*. 29 juillet 2014. Vol. 10, n° 9, pp. 2289-2298. DOI 10.1039/c4mb00223g.

BERTRAND, Samuel, BOHNI, Nadine, SCHNEE, Sylvain, SCHUMPP, Olivier, GINDRO, Katia et WOLFENDER, Jean-Luc, 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*. 1 novembre 2014. Vol. 32, n° 6, pp. 1180-1204. DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.03.001.

BERTRAND, Samuel, SCHUMPP, Olivier, BOHNI, Nadine, MONOD, Michel, GINDRO, Katia et WOLFENDER, Jean-Luc, 2013. De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*. 28 juin 2013. Vol. 76, n° 6, pp. 1157-1165. DOI 10.1021/np400258f.

BETHKE, James A et CLOYD, Raymond A, 2009. Pesticide use in ornamental production: what are the benefits? *Pest Management Science*. 2009. Vol. 65, n° 4, pp. 345-350. DOI 10.1002/ps.1695.

BHARUCHA, Ud, PATEL, Kc et TRIVEDI, Ub, 2013. Antifungal activity of catechol type siderophore produced by *Bacillus* sp. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 15 octobre 2013. Vol. 4, n° 4, pp. 528-531.

BILIOURIS, Konstantinos, BABSON, David, SCHMIDT-DANNERT, Claudia et KAZNESSIS, Yiannis N., 2012. Stochastic simulations of a synthetic bacteria-yeast ecosystem. *BMC Systems Biology*. 6 juin 2012. Vol. 6, n° 1, pp. 58. DOI 10.1186/1752-0509-6-58.

BILLS, Gerald F. et GLOER, James B., 2017. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. In : *The Fungal Kingdom*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1087-1119. ISBN 978-1-68367-082-7.

BLAAK, H. et SCHREMPF, H., 1995. Binding and substrate specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* chitinase in comparison with its proteolytically processed form. *European Journal of Biochemistry*. 1 avril 1995. Vol. 229, n° 1, pp. 132-139. DOI 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20447.x.

BLACK, Brenna A., ZANNINI, Emanuele, CURTIS, Jonathan M. et GÄNZLE, Michael G., 2013. Antifungal Hydroxy Fatty Acids Produced during Sourdough Fermentation: Microbial and Enzymatic Pathways, and Antifungal Activity in Bread. *Applied and Environmental Microbiology*. mars 2013. Vol. 79, n° 6, pp. 1866-1873. DOI 10.1128/AEM.03784-12.

BLACKWELL, Meredith, 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*. 2011. Vol. 98, n° 3, pp. 426-438. DOI 10.3732/ajb.1000298.

BLANCO-VARGAS, Andrea, RODRÍGUEZ-GACHA, Lina M., SÁNCHEZ-CASTRO, Natalia, GARZÓN-JARAMILLO, Rafael, PEDROZA-CAMACHO, Lucas D., POUTOUPIÑALES, Raúl A., RIVERA-HOYOS, Claudia M., DÍAZ-ARIZA, Lucía A. et PEDROZA-RODRÍGUEZ, Aura M., 2020. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 1 octobre 2020. Vol. 6, n° 10, pp. e05218. DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e05218.

BLEVE, Gianluca, GRIECO, Francesco, COZZI, Giuseppe, LOGRIECO, Antonio et VISCONTI, Angelo, 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*. 25 avril 2006. Vol. 108, n° 2, pp. 204-209. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004.

BLIN, Kai, SHAW, Simon, KLOOSTERMAN, Alexander M., CHARLOP-POWERS, Zach, VAN WEZEL, Gilles P., MEDEMA, Marnix H. et WEBER, Tilmann, 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*. 2 juillet 2021. Vol. 49, n° W1, pp. W29-W35. DOI 10.1093/nar/gkab335.

BOOTH, C., 1971. The genus *Fusarium*. *The genus Fusarium*. 1971.

BOUBAKER, H., KARIM, H., EL HAMDAOUI, A., MSANDA, F., LEACH, D., BOMBARDA, I., VANLOOT, P., ABBAD, A., BOUDYACH, E. H. et AIT BEN AOUMAR, A., 2016. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*. 1 août 2016. Vol. 86, pp. 95-101. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.03.036.

BRASIL, Veruska Lima Moura, RAMOS PINTO, Mariana Bitu, BONAN, Roberta Ferreti, KOWALSKI, Luiz Paulo et DA CRUZ PEREZ, Danyel Elias, 2018. Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2018. Vol. 47, n° 7, pp. 641-651. DOI 10.1111/jop.12701.

BRAUD, Armelle, GEOFFROY, Valérie, HOEGY, Françoise, MISLIN, Gaëtan L. A. et SCHALK, Isabelle J., 2010. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*. 2010. Vol. 2, n° 3, pp. 419-425. DOI 10.1111/j.1758-2229.2009.00126.x.

BRAUTASET, Trygve, SEKUROVA, Olga N, SLETTA, Håvard, ELLINGSEN, Trond E, STRØM, Arne R, VALLA, Svein et ZOTCHEV, Sergey B, 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry & Biology*. 1 juin 2000. Vol. 7, n° 6, pp. 395-403. DOI 10.1016/S1074-5521(00)00120-4.

BREUKINK, E., WIEDEMANN, I., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O. P., SAHL, H. G. et DE KRUIJFF, B., 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science (New York, N.Y.)*. 17 décembre 1999. Vol. 286, n° 5448, pp. 2361-2364. DOI 10.1126/science.286.5448.2361.

BRZEZINSKA, Maria Swiontek et JANKIEWICZ, Urszula, 2012. Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Current Microbiology*. 1 décembre 2012. Vol. 65, n° 6, pp. 666-672. DOI 10.1007/s00284-012-0208-2.

- BULL, C. T., WADSWORTH, M. L., SORENSEN, K. N., TAKEMOTO, J. Y., AUSTIN, R. K. et SMILANICK, J. L., 1998. Syringomycin E Produced by Biological Control Agents Controls Green Mold on Lemons. *Biological Control*. 1 juin 1998. Vol. 12, n° 2, pp. 89-95. DOI 10.1006/bcon.1998.0622.
- BURMEISTER, Alina et GRÜNBERGER, Alexander, 2020. Microfluidic cultivation and analysis tools for interaction studies of microbial co-cultures. *Current Opinion in Biotechnology*. 1 avril 2020. Vol. 62, pp. 106-115. DOI 10.1016/j.copbio.2019.09.001.
- BUTLER, M. J., GARDINER, R. B. et DAY, A. W., 2005. Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biological Control*. 1 février 2005. Vol. 32, n° 2, pp. 326-336. DOI 10.1016/j.biocontrol.2004.08.008.
- BUXDORF, Kobi, RAHAT, Ido, GAFNI, Aviva et LEVY, Maggie, 2013. The Epiphytic Fungus *Pseudozyma aphidis* Induces Jasmonic Acid- and Salicylic Acid/Nonexpressor of PR1-Independent Local and Systemic Resistance. *Plant Physiology*. 1 avril 2013. Vol. 161, n° 4, pp. 2014-2022. DOI 10.1104/pp.112.212969.
- BUZZINI, P., 2001. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis-Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *Journal of Applied Microbiology*. mai 2001. Vol. 90, n° 5, pp. 843-847. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01319.x.
- BYUN, Chang Kyu, HWANG, Hyundoo, CHOI, Woon Sun, YAGUCHI, Toshiyuki, PARK, Jiwoon, KIM, Dasol, MITCHELL, Robert J., KIM, Taesung, CHO, Yoon-Kyoung et TAKAYAMA, Shuichi, 2013. Productive Chemical Interaction between a Bacterial Microcolony Couple Is Enhanced by Periodic Relocation. *Journal of the American Chemical Society*. 13 février 2013. Vol. 135, n° 6, pp. 2242-2247. DOI 10.1021/ja3094923.
- CABANES, J., CHAZARRA, S. et GARCIA-CARMONA, F., 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. décembre 1994. Vol. 46, n° 12, pp. 982-985. DOI 10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x.
- CAI, Feng, YU, Guanghui, WANG, Ping, WEI, Zhong, FU, Lin, SHEN, Qirong et CHEN, Wei, 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1 décembre 2013. Vol. 73, pp. 106-113. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.08.011.
- CALHELHA, Ricardo C., ANDRADE, João V., FERREIRA, Isabel C. et ESTEVINHO, Leticia M., 2006. Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiology*. 1 juin 2006. Vol. 23, n° 4, pp. 393-398. DOI 10.1016/j.fm.2005.04.008.
- CANTRELL, C. L., SCHRADER, K. K., MAMONOV, L. K., SITPAEVA, G. T., KUSTOVA, T. S., DUNBAR, C. et WEDGE, D. E., 2005. Isolation and Identification of Antifungal and Antialgal Alkaloids from *Haplophyllum sieversii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 octobre 2005. Vol. 53, n° 20, pp. 7741-7748. DOI 10.1021/jf051478v.
- CAO, Yun, ZHANG, Zhenhua, LING, Ning, YUAN, Yujuan, ZHENG, Xinyan, SHEN, Biao et SHEN, Qirong, 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*. 1 juillet 2011. Vol. 47, n° 5, pp. 495-506. DOI 10.1007/s00374-011-0556-2.

- CHAGAS, Fernanda O., DIAS, Luís G. et PUPO, Mônica T., 2013. A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. *Journal of Chemical Ecology*. octobre 2013. Vol. 39, n° 10, pp. 1335-1342. DOI 10.1007/s10886-013-0351-7.
- CHAMBERS, Janice E., GREIM, Helmut, KENDALL, Ronald J., SEGNER, Helmut, SHARPE, Richard M. et VAN DER KRAAK, Glen, 2014. Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical Reviews in Toxicology*. 1 février 2014. Vol. 44, n° 2, pp. 176-210. DOI 10.3109/10408444.2013.855163.
- CHANG, J.-H., SHIM, Y.y., CHA, S.-K. et CHEE, K.m., 2010. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. Vol. 109, n° 1, pp. 220-230. DOI 10.1111/j.1365-2672.2009.04648.x.
- CHANG, Jui-Jen, CHOU, Chia-Hung, HO, Cheng-Yu, CHEN, Wei-En, LAY, Jiunn-Jyi et HUANG, Chieh-Chen, 2008. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 1 octobre 2008. Vol. 33, n° 19, pp. 5137-5146. DOI 10.1016/j.ijhydene.2008.05.021.
- CHANG, P.-K., 2019. Genome-wide nucleotide variation distinguishes *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* and helps to reveal origins of atoxigenic *A. flavus* biocontrol strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2019. Vol. 127, n° 5, pp. 1511-1520. DOI 10.1111/jam.14419.
- CHANG, Wen-Teish, CHEN, Chin-Shuh et WANG, San-Lang, 2003. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiology*. août 2003. Vol. 47, n° 2, pp. 102-108. DOI 10.1007/s00284-002-3955-7.
- CHANOS, Panagiotis et MYGIND, Tina, 2016. Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 mai 2016. Vol. 100, n° 10, pp. 4297-4308. DOI 10.1007/s00253-016-7486-8.
- CHEN, Huiqin, DALETOS, Georgios, ABDEL-AZIZ, Mohamed S., THOMY, Dhana, DAI, Haofu, BRÖTZ-OESTERHELT, Heike, LIN, Wenhan et PROKSCH, Peter, 2015. Inducing secondary metabolite production by the soil-dwelling fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co-culture. *Phytochemistry Letters*. 1 juin 2015. Vol. 12, pp. 35-41. DOI 10.1016/j.phytol.2015.02.009.
- CHEN, Kai-Jian, TANG, Ji-Chao, XU, Bao-Hong, LAN, Shi-Le et CAO, Yankun, 2019. Degradation enhancement of rice straw by co-culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trichoderma viride*. *Scientific Reports*. 23 décembre 2019. Vol. 9, n° 1, pp. 19708. DOI 10.1038/s41598-019-56123-5.
- CHEN, Tingting, WANG, Xiaonan, ZHUANG, Lei, SHAO, Alan, LU, Yinghua et ZHANG, Haoran, 2021. Development and optimization of a microbial co-culture system for heterologous indigo biosynthesis. *Microbial Cell Factories*. 4 août 2021. Vol. 20, n° 1, pp. 154. DOI 10.1186/s12934-021-01636-w.
- CHEN, Xin-Yue, SUN, Hui-Zhong, QIAO, Bin, MIAO, Chang-Hao, HOU, Zheng-Jie, XU, Shu-Jing, XU, Qiu-Man et CHENG, Jing-Sheng, 2022. Improved the lipopeptide production of *Bacillus amyloliquefaciens* HM618 under co-culture with the recombinant *Corynebacterium glutamicum* producing high-level proline. *Bioresource Technology*. 1 avril 2022. Vol. 349, pp. 126863. DOI 10.1016/j.biortech.2022.126863.

- CHEN YUN, KISTLER HAROLD CORBY, et MA ZHONGHUA, 2020. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management. *Annual review of phytopathology*. 2020. Vol. 57, pp. 15-39. DOI 10.1146/annurev-phyto-082718-100318.
- CHOUHDARY, Bharti, NAGPURE, Anand et GUPTA, Rajinder K., 2015. Biological control of toxigenic citrus and papaya-rotting fungi by *Streptomyces violascens* MT7 and its extracellular metabolites. *Journal of Basic Microbiology*. décembre 2015. Vol. 55, n° 12, pp. 1343-1356. DOI 10.1002/jobm.201500323.
- CHRISTIANSEN, Line, ALANIN, Katrine Skov, PHIPPEN, Christopher B. W., OLSSON, Stefan, STOUGAARD, Peter et HENNESSY, Rosanna C., 2020. Fungal-Associated Molecules Induce Key Genes Involved in the Biosynthesis of the Antifungal Secondary Metabolites Nunamycin and Nunapeptin in the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* In5. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 octobre 2020. Vol. 86, n° 21, pp. e01284-20. DOI 10.1128/AEM.01284-20.
- CHUANG, John S, RIVOIRE, Olivier et LEIBLER, Stanislas, 2010. Cooperation and Hamilton's rule in a simple synthetic microbial system. *Molecular Systems Biology*. janvier 2010. Vol. 6, n° 1, pp. 398. DOI 10.1038/msb.2010.57.
- COHN, Dr Ferdinand, 1872. Untersuchungen über Bacterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 1872. Vol. 1, n° (Heft 2), pp. 127-224.
- COLOGNA, Nicholas de Mojana di, GÓMEZ-MENDOZA, Diana Paola, ZANOELO, Fabiana Fonseca, GIANNESI, Giovana Cristina, GUIMARÃES, Nelciele Cavalieri de Alencar, MOREIRA, Leonora Rios de Souza, FILHO, Edivaldo Ximenes Ferreira et RICART, Carlos André Ornelas, 2018. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology*. 1 février 2018. Vol. 109, pp. 1-10. DOI 10.1016/j.enzmictec.2017.08.007.
- CORREA, Olga S., MONTECCHIA, Marcela S., BERTI, María F., FERNÁNDEZ FERRARI, María C., PUCHEU, Norma L., KERBER, Norma L. et GARCÍA, Augusto F., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 1 février 2009. Vol. 41, n° 2, pp. 185-194. DOI 10.1016/j.apsoil.2008.10.007.
- CORTÉS-ZAVALA, O., LÓPEZ-MALO, A., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. et GARCÍA, H. S., 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*. 3 mars 2014. Vol. 173, pp. 30-35. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016.
- COTTY, P. J., ANTILLA, L. et WAKELYN, P. J., 2007. Competitive exclusion of aflatoxin producers: farmer-driven research and development. *Biological control: a global perspective*. 2007. pp. 241-253.
- CSUTAK, Ortansa, VASSU, Tatiana, SARBU, Ionela, STOICA, Ileana et CORNEA, Petruta, 2013. Antagonistic activity of three newly isolated yeast strains from the surface of fruits. *Food Technology and Biotechnology*. 1 janvier 2013. Vol. 51, n° 1, pp. 70-78.

CUTLER, Horace G., HIMMELSBACH, David S., ARRENDALE, Richard F., COLE, Patsy D. et COX, Richard H., 1989. Koninginin A: A Novel Plant Growth Regulator from *Trichoderma koningii*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1 octobre 1989. Vol. 53, n° 10, pp. 2605-2611. DOI 10.1080/00021369.1989.10869746.

DAMANN JR., K.E., 2015. Atoxigenic *Aspergillus flavus* biological control of aflatoxin contamination: what is the mechanism? *World Mycotoxin Journal*. 1 janvier 2015. Vol. 8, n° 2, pp. 235-244. DOI 10.3920/WMJ2014.1719.

DAUB, Margaret E. et EHRENSHAFT, Marilyn, 2000. The Photoactivated Cercospora Toxin Cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. *Annual Review of Phytopathology*. septembre 2000. Vol. 38, pp. 461-490. DOI 10.1146/annurev.phyto.38.1.461.

DAVID, Baliah V., CHANDRASEHAR, Govindan et SELVAM, Pamila N., 2018. Chapter 10 - *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. In : PRASAD, Ram, GILL, Sarvajeet S. et TUTEJA, Narendra (éd.), *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier. pp. 221-243. ISBN 978-0-444-63987-5.

DE MICCOLIS ANGELINI, Rita M, ROTOLO, Caterina, GERIN, Donato, ABATE, Domenico, POLLASTRO, Stefania et FARETRA, Francesco, 2019. Global transcriptome analysis and differentially expressed genes in grapevine after application of the yeast-derived defense inducer cerevisiane. *Pest Management Science*. 2019. Vol. 75, n° 7, pp. 2020-2033. DOI 10.1002/ps.5317.

DE VUYST, Luc et LEROY, Frédéric, 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Microbial Physiology*. 2007. Vol. 13, n° 4, pp. 194-199. DOI 10.1159/000104752.

DEAN, Ralph, KAN, Jan a. L. Van, PRETORIUS, Zacharias A., HAMMOND-KOSACK, Kim E., PIETRO, Antonio Di, SPANU, Pietro D., RUDD, Jason J., DICKMAN, Marty, KAHMANN, Regine, ELLIS, Jeff et FOSTER, Gary D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 1 mai 2012. Vol. 13, n° 4, pp. 414-430. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.

DE BRUIJN, I. et RAAIJMAKERS, J. M., 2009. Regulation of Cyclic Lipopeptide Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP Protease. *Journal of Bacteriology*. 15 mars 2009. Vol. 191, n° 6, pp. 1910-1923. DOI 10.1128/JB.01558-08.

DEGANI, Ofir, KHATIB, Soliman, BECHER, Paz, GORDANI, Asaf et HARRIS, Raviv, 2021. *Trichoderma asperellum* Secreted 6-Pentyl- α -Pyrone to Control *Magnaportheopsis maydis*, the Maize Late Wilt Disease Agent. *Biology*. septembre 2021. Vol. 10, n° 9, pp. 897. DOI 10.3390/biology10090897.

DELEU, Magali, PAQUOT, Michel et NYLANDER, Tommy, 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 15 mars 2005. Vol. 283, n° 2, pp. 358-365. DOI 10.1016/j.jcis.2004.09.036.

DE LIMA PROCÓPIO, Rudi Emerson, DA SILVA, Ingrid Reis, MARTINS, Mayra Kassawara, DE AZEVEDO, João Lúcio et DE ARAÚJO, Janete Magali, 2012. Antibiotics

produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 1 septembre 2012. Vol. 16, n° 5, pp. 466-471. DOI 10.1016/j.bjid.2012.08.014.

DE VRIES, Ronald P. et VISSER, Jaap, 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. décembre 2001. Vol. 65, n° 4, pp. 497-522. DOI 10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001.

DI CAGNO, Raffaella, DE ANGELIS, Maria, CALASSO, Maria, VINCENTINI, Olimpia, VERNOCCHI, Pamela, NDAGIJIMANA, Maurice, DE VINCENZI, Massimo, DESSI, Maria Rita, GUERZONI, Maria Elisabetta et GOBBETTI, Marco, 2010. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *PROTEOMICS*. 2010. Vol. 10, n° 11, pp. 2175-2190. DOI 10.1002/pmic.200900565.

DÍAZ, Mario, HERRERO, Mónica, GARCÍA, Luis A. et QUIRÓS, Covadonga, 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 15 février 2010. Vol. 48, n° 3, pp. 385-407. DOI 10.1016/j.bej.2009.07.013.

DIMKIĆ, Ivica, ŽIVKOVIĆ, Svetlana, BERIĆ, Tanja, IVANOVIĆ, Žarko, GAVRILOVIĆ, Veljko, STANKOVIĆ, Slaviša et FIRA, Djordje, 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*. 1 juin 2013. Vol. 65, n° 3, pp. 312-321. DOI 10.1016/j.biocontrol.2013.03.012.

DONOHUE, D. C., DEIGHTON, M., AHOKAS, J. T. et SALMINEN, S., 1993. Toxicity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria*. 1993. pp. 307-313.

DORNER, J. W. et LAMB, M. C., 2006. Development and commercial use of afla-Guard®, an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotoxin Research*. 1 mars 2006. Vol. 22, n° 1, pp. 33-38. DOI 10.1007/BF02954555.

DORNER, Joe W., 2009. Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxic strain of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*. avril 2009. Vol. 72, n° 4, pp. 801-804. DOI 10.4315/0362-028x-72.4.801.

DUBERN, Jean-Frédéric, LAGENDIJK, Ellen L., LUGTENBERG, Ben J. J. et BLOEMBERG, Guido V., 2005. The Heat Shock Genes dnaK, dnaJ, and grpE Are Involved in Regulation of Putisolvin Biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *Journal of Bacteriology*. septembre 2005. Vol. 187, n° 17, pp. 5967-5976. DOI 10.1128/JB.187.17.5967-5976.2005.

DUIJFF, B. J., MEIJER, J. W., BAKKER, P. a. H. M. et SCHIPPERS, B., 1993. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Netherlands Journal of Plant Pathology (Netherlands)*. 1993.

DUNLOP, Robert W., SIMON, Andrew, SIVASITHAMPARAM, Krishnapillai et GHISALBERTI, Emilio L., 1989. An Antibiotic from *Trichoderma koningii* Active Against Soilborne Plant Pathogens. *Journal of Natural Products*. janvier 1989. Vol. 52, n° 1, pp. 67-74. DOI 10.1021/np50061a008.

- DWEBBA, C. C., FIGLAN, S., SHIMELIS, H. A., MOTAUNG, T. E., SYDENHAM, S., MWADZINGENI, L. et TSILO, T. J., 2017. Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*. 1 janvier 2017. Vol. 91, pp. 114-122. DOI 10.1016/j.cropro.2016.10.002.
- EHRlich, K., 1987. Effect on aflatoxin production of competition between wild-type and mutant strains of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. 1 février 1987. Vol. 97, n° 2, pp. 93-96. DOI 10.1007/BF00436844.
- EL HADRAMI, Abdelbasset, ADAM, Lorne R., EL HADRAMI, Ismail et DAAYF, Fouad, 2010. Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*. 30 mars 2010. Vol. 8, n° 4, pp. 968-987. DOI 10.3390/md8040968.
- ELAASSER, Mahmoud, ABDEL-AZIZ, Marwa et EL-KASSAS, Rasha, 2011. Antioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor activities of pyranone derivative obtained from *Aspergillus candidus*. *J Microbiol Biotech Res*. 1 janvier 2011. Vol. 1, pp. 5-17.
- ELAD, Y., KIRSHNER, B., YEHUDA, N. et SZTEJNBERG, A., 2004. Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. *BioControl*. 2004. DOI 10.1023/A:1009919417481.
- EL-HASAN, A., WALKER, F., SCHÖNE, J. et BUCHENAUER, H., 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 1 avril 2007. Vol. 114, n° 2, pp. 62-68. DOI 10.1007/BF03356205.
- EL-SHORA, Hamed M., EL-SHARKAWY, Reyad M., KHATEB, Aiah M. et DARWISH, Doaa B., 2021. Production and immobilization of β -glucanase from *Aspergillus niger* with its applications in bioethanol production and biocontrol of phytopathogenic fungi. *Scientific Reports*. 25 octobre 2021. Vol. 11, n° 1, pp. 21000. DOI 10.1038/s41598-021-00237-2.
- EL-TARABILY, Khaled A., 2003. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. *Australian Journal of Botany*. 2003. Vol. 51, n° 3, pp. 257-266. DOI 10.1071/bt02107.
- ESMAEEL, Qassim, PUPIN, Maude, JACQUES, Philippe et LECLÈRE, Valérie, 2018. Nonribosomal peptides and polyketides of *Burkholderia*: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*. 1 octobre 2018. Vol. 25, n° 30, pp. 29794-29807. DOI 10.1007/s11356-017-9166-3.
- ESPOSITO, Elisa et SILVA, Manuela da, 1998. Systematics and Environmental Application of the Genus *Trichoderma*. *Critical Reviews in Microbiology*. 1 janvier 1998. Vol. 24, n° 2, pp. 89-98. DOI 10.1080/10408419891294190.
- EVERTS, Kathryn L. et HIMMELSTEIN, Jennifer C., 2015. Fusarium wilt of watermelon: Towards sustainable management of a re-emerging plant disease. *Crop Protection*. 1 juillet 2015. Vol. 73, pp. 93-99. DOI 10.1016/j.cropro.2015.02.019.
- EVIDENTE, Antonio, CRISTINZIO, Gennaro, PUNZO, Biancavalera, ANDOLFI, Anna, TESTA, Antonino et MELCK, Dominique, 2009. Flufuran, an antifungal 3,5-disubstituted

furan produced by *Aspergillus flavus* link. *Chemistry & Biodiversity*. mars 2009. Vol. 6, n° 3, pp. 328-334. DOI 10.1002/cbdv.200800292.

EVSTIGNEEVA, Anna, RAOULT, Didier, KARPACHEVSKIY, Lev et LA SCOLA, BernardYR 2009, 2009. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*. 2009. Vol. 155, n° 2, pp. 657-664. DOI 10.1099/mic.0.022970-0.

FANG, Hui, XU, Jin-Bo, NIE, Yong et WU, Xiao-Lei, 2021. Pan-genomic analysis reveals that the evolution of *Dietzia* species depends on their living habitats. *Environmental Microbiology*. février 2021. Vol. 23, n° 2, pp. 861-877. DOI 10.1111/1462-2920.15176.

FAVILLA, M., MACCHIA, L., GALLO, A. et ALTOMARE, C., 2006. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*. 1 novembre 2006. Vol. 44, n° 11, pp. 1922-1931. DOI 10.1016/j.fct.2006.06.024.

FERNANDO, W. G. Dilantha, RAMARATHNAM, Rajesh, KRISHNAMOORTHY, Akkanas S. et SAVCHUK, Sarah C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*. 1 mai 2005. Vol. 37, n° 5, pp. 955-964. DOI 10.1016/j.soilbio.2004.10.021.

FIFANI, Barbara, STEELS, Sebastien, HELMUS, Catherine, DELACUVELLERIE, Alice, DERACINOIS, Barbara, PHALIP, Vincent, DELVIGNE, Frank et JACQUES, Philippe, 2022. Coculture of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* Based on Metabolic Cross-Feeding Modulates Lipopeptide Production. *Microorganisms*. mai 2022. Vol. 10, n° 5, pp. 1059. DOI 10.3390/microorganisms10051059.

FIORE, Alberto, MANNINA, Luisa, SOBOLEV, Anatoli P., SALZANO, Anna Maria, SCALONI, Andrea, GRGURINA, Ingeborg, FULLONE, Maria Rosaria, GALLO, Monica, SWASEY, Camille, FOGLIANO, Vincenzo et TAKEMOTO, Jon Y., 2008. Bioactive lipopeptides of ice-nucleating snow bacterium *Pseudomonas syringae* strain 31R1. *FEMS Microbiology Letters*. 1 septembre 2008. Vol. 286, n° 2, pp. 158-165. DOI 10.1111/j.1574-6968.2008.01247.x.

FISHER, Matthew C., HENK, Daniel. A., BRIGGS, Cheryl J., BROWNSTEIN, John S., MADOFF, Lawrence C., MCCRAW, Sarah L. et GURR, Sarah J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 11 avril 2012. Vol. 484, n° 7393, pp. 10.1038/nature10947. DOI 10.1038/nature10947.

FLORES, C., CASASANERO, R., TREJO-HERNÁNDEZ, M.r., GALINDO, E. et SERRANO-CARREÓN, L., 2010. Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. Vol. 108, n° 3, pp. 810-817. DOI 10.1111/j.1365-2672.2009.04493.x.

FOKIALAKIS, Nikolas, CANTRELL, Charles L., DUKE, Stephen O., SKALTSOUNIS, Alexios L. et WEDGE, David E., 2006. Antifungal Activity of Thiophenes from *Echinops ritro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 mars 2006. Vol. 54, n° 5, pp. 1651-1655. DOI 10.1021/jf052702j.

- FONTANA, Gianfranco, 2010. Current Bioactive Azole-Containing Natural Products. *Current Bioactive Compounds*. 1 décembre 2010. Vol. 6, n° 4, pp. 284-308. DOI 10.2174/157340710793237290.
- FRAVEL, D., OLIVAIN, C. et ALABOUVETTE, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*. 2003. Vol. 157, n° 3, pp. 493-502. DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x.
- FRAVEL, D. R., 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual review of phytopathology*. 2005.
- FRAVEL, D. R., DEAHL, K. L. et STOMMEL, J. R., 2005. Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. *Biological Control*. 1 août 2005. Vol. 34, n° 2, pp. 165-169. DOI 10.1016/j.biocontrol.2005.04.007.
- FREEMAN, 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. 2008. DOI 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- FRISVAD, Jens C., 2012. Media and Growth Conditions for Induction of Secondary Metabolite Production. In : KELLER, Nancy P. et TURNER, Geoffrey (éd.), *Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols*. Totowa, NJ : Humana Press. pp. 47-58. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-122-6.
- FRISVAD, Jens C., MØLLER, Lars L. H., LARSEN, Thomas O., KUMAR, Ravi et ARNAU, José, 2018. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 novembre 2018. Vol. 102, n° 22, pp. 9481-9515. DOI 10.1007/s00253-018-9354-1.
- GAFNI, Aviva, CALDERON, Claudia E., HARRIS, Raviv, BUXDORF, Kobi, DAFA-BERGER, Avis, ZEILINGER-REICHERT, Einat et LEVY, Maggie, 2015. Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6, pp. 132. DOI 10.3389/fpls.2015.00132.
- GAJERA, Harsukh, RAKHOLIYA, Kalu et VAKHARIA, Dinesh, 2011. Bioefficacy of *Trichoderma* Isolates Against *Aspergillus niger* Van Tieghem Inciting Collar Rot in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of plant protection research*. 2011. Vol. 51, n° 3, pp. 240-247. DOI 10.2478/v10045-011-0040-x.
- GALLOU, Adrien, CRANENBROUCK, Sylvie et DECLERCK, Stéphane, 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*. 1 juin 2009. Vol. 124, n° 2, pp. 219-230. DOI 10.1007/s10658-008-9407-x.
- GANGWAR, Mamta, SINGH, Vineeta, PANDEY, Asheesh Kumar, TRIPATHI, C. K. M. et MISHRA, B. N., 2016. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces violascens* NRRL B2700. *Indian Journal of Experimental Biology*. janvier 2016. Vol. 54, n° 1, pp. 64-71.

GARCÍA, Cristina, RENDUELES, Manuel et DÍAZ, Mario, 2017. Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1 juillet 2017. Vol. 40, n° 7, pp. 1111-1122. DOI 10.1007/s00449-017-1773-3.

GARCIA, Daiana, RAMOS, Antonio J., SANCHIS, Vicente et MARÍN, Sonia, 2012. Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *International Journal of Food Microbiology*. 1 février 2012. Vol. 153, n° 1, pp. 21-27. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.010.

GEISER, David M., AOKI, Takayuki, BACON, Charles W., BAKER, Scott E., BHATTACHARYYA, Madan K., BRANDT, Mary E., BROWN, Daren W., BURGESS, Lester W., CHULZE, Sofia, COLEMAN, Jeffrey J., CORRELL, James C., COVERT, Sarah F., CROUS, Pedro W., CUOMO, Christina A., DE HOOG, G. Sybren, DI PIETRO, Antonio, ELMER, Wade H., EPSTEIN, Lynn, FRANDBSEN, Rasmus J. N., FREEMAN, Stanley, GAGKAEVA, Tatiana, GLENN, Anthony E., GORDON, Thomas R., GREGORY, Nancy F., HAMMOND-KOSACK, Kim E., HANSON, Linda E., JÍMENEZ-GASCO, María Del Mar, KANG, Seogchan, KISTLER, H. Corby, KULDAU, Gretchen A., LESLIE, John F., LOGRIECO, Antonio, LU, Guozhong, LYSØE, Erik, MA, Li-Jun, MCCORMICK, Susan P., MIGHELI, Quirico, MORETTI, Antonio, MUNAUT, Françoise, O'DONNELL, Kerry, PFENNING, Ludwig, PLOETZ, Randy C., PROCTOR, Robert H., REHNER, Stephen A., ROBERT, Vincent A. R. G., ROONEY, Alejandro P., BIN SALLEH, Baharuddin, SCANDIANI, Maria Mercedes, SCAUFLAIRE, Jonathan, SHORT, Dylan P. G., STEENKAMP, Emma, SUGA, Haruhisa, SUMMERELL, Brett A., SUTTON, Deanna A., THRANE, Ulf, TRAIL, Francis, VAN DIEPENINGEN, Anne, VANETTEN, Hans D., VILJOEN, Altus, WAALWIJK, Cees, WARD, Todd J., WINGFIELD, Michael J., XU, Jin-Rong, YANG, Xiao-Bing, YLI-MATTILA, Tapani et ZHANG, Ning, 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*. mai 2013. Vol. 103, n° 5, pp. 400-408. DOI 10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE.

GERBORE, J., BENHAMOU, N., VALLANCE, J., LE FLOCH, G., GRIZARD, D., REGNAULT-ROGER, C. et REY, P., 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research International*. avril 2014. Vol. 21, n° 7, pp. 4847-4860. DOI 10.1007/s11356-013-1807-6.

GERHARDSON, Berndt, 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*. 1 août 2002. Vol. 20, n° 8, pp. 338-343. DOI 10.1016/S0167-7799(02)02021-8.

GEUDENS, Niels et MARTINS, José C., 2018. Cyclic Lipodepsipeptides From *Pseudomonas* spp. – Biological Swiss-Army Knives. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9.

GHISALBERTI, E. L. et SIVASITHAMPARAM, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*. 1 janvier 1991. Vol. 23, n° 11, pp. 1011-1020. DOI 10.1016/0038-0717(91)90036-J.

GLICKMANN, Eric, GARDAN, Louis, JACQUET, Sylvie, HUSSAIN, Shafik, ELASRI, Miena, PETIT, Annik et DESSAUX, Yves, 1998. Auxin Production Is a Common Feature of Most Pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. février 1998. Vol. 11, n° 2, pp. 156-162. DOI 10.1094/MPMI.1998.11.2.156.

- GOBBETTI, M., CORSETTI, A. et ROSSI, J., 1994. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 juin 1994. Vol. 41, n° 4, pp. 456-460. DOI 10.1007/BF00939035.
- GOERS, Lisa, FREEMONT, Paul et POLIZZI, Karen M., 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*. 6 juillet 2014. Vol. 11, n° 96, pp. 20140065. DOI 10.1098/rsif.2014.0065.
- GOMAA, Eman Zakaria, 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*. février 2012. Vol. 50, n° 1, pp. 103-111. DOI 10.1007/s12275-012-1343-y.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Rosa M., RIAL-OTERO, Raquel, CANCHO-GRANDE, Beatriz et SIMAL-GÁNDARA, Jesús, 2008. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. *Food Chemistry*. 1 avril 2008. Vol. 107, n° 3, pp. 1342-1347. DOI 10.1016/j.foodchem.2007.09.045.
- GOODAY, Graham W., 1990. The Ecology of Chitin Degradation. In : MARSHALL, K. C. (éd.), *Advances in Microbial Ecology*. Boston, MA : Springer US. pp. 387-430. *Advances in Microbial Ecology*. ISBN 978-1-4684-7612-5.
- GORDON, Thomas R., 2017. *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*. 2017. Vol. 55, n° 1, pp. 23-39. DOI 10.1146/annurev-phyto-080615-095919.
- GÖTZE, Sebastian et STALLFORTH, Pierre, 2020. Structure, properties, and biological functions of nonribosomal lipopeptides from pseudomonads. *Natural Product Reports*. 2020. Vol. 37, n° 1, pp. 29-54. DOI 10.1039/C9NP00022D.
- GOURAMA, Hassan et BULLERMAN, Lloyd B., 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds†: A Review. *Journal of Food Protection*. 1 décembre 1995. Vol. 58, n° 12, pp. 1395-1404. DOI 10.4315/0362-028X-58.12.1395.
- GRAY, E. J. et SMITH, D. L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 1 mars 2005. Vol. 37, n° 3, pp. 395-412. DOI 10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
- GUN LEE, D., SHIN, S. Y., MAENG, C. Y., JIN, Z. Z., KIM, K. L. et HAHM, K. S., 1999. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 5 octobre 1999. Vol. 263, n° 3, pp. 646-651. DOI 10.1006/bbrc.1999.1428.
- GUPTA, Apoorv, REIZMAN, Irene M. Brockman, REISCH, Christopher R. et PRATHER, Kristala L. J., 2017. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. *Nature Biotechnology*. mars 2017. Vol. 35, n° 3, pp. 273-279. DOI 10.1038/nbt.3796.
- GUREVICH, Alexey, SAVELIEV, Vladislav, VYAHHI, Nikolay et TESLER, Glenn, 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 15 avril 2013. Vol. 29, n° 8, pp. 1072-1075. DOI 10.1093/bioinformatics/btt086.

HAHN, Matthias, 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*. 1 octobre 2014. Vol. 7, n° 4, pp. 133-141. DOI 10.1007/s12154-014-0113-1.

HALECKER, Sandra, WENNRICH, Jan-Peer, RODRIGO, Sara, ANDRÉE, Nicole, RABSCH, Laura, BASCHIEN, Christiane, STEINERT, Michael, STADLER, Marc, SURUP, Frank et SCHULZ, Barbara, 2020. Fungal endophytes for biocontrol of ash dieback: The antagonistic potential of *Hypoxylon rubiginosum*. *Fungal Ecology*. 1 juin 2020. Vol. 45, pp. 100918. DOI 10.1016/j.funeco.2020.100918.

HAMMAMI, Walid, CASTRO, Candy Quiroga, RÉMUS-BOREL, Wilfried, LABBÉ, Caroline et BÉLANGER, Richard R., 2011. Ecological Basis of the Interaction between *Pseudozyma flocculosa* and Powdery Mildew Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 1 février 2011. Vol. 77, n° 3, pp. 926-933. DOI 10.1128/AEM.01255-10.

HAMMES, Walter P. et HERTEL, Christian, 2015. *Lactobacillus*. In : *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1-76. ISBN 978-1-118-96060-8.

HARIGHI, M.J., ZAMANI, Mohammadreza et M, Motallebi, 2007. Evaluation of Antifungal Activity of Purified Chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnology*. 1 janvier 2007. Vol. 6. DOI 10.3923/biotech.2007.28.33.

HARMAN, G. E., PETZOLDT, R, COMIS, A et 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*. février 2004. Vol. 94, n° 2. DOI 10.1094/PHYTO.2004.94.2.147.

HARRISON, L., TELOW, D. B., RINALDI, M. et STROBEL, G., 1991. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *Journal of General Microbiology*. décembre 1991. Vol. 137, n° 12, pp. 2857-2865. DOI 10.1099/00221287-137-12-2857.

HAYAT, Sikandar, CHENG, Zihui, AHMAD, Husain, ALI, Muhammad, CHEN, Xuejin et WANG, Mengyi, 2016. Garlic, from Remedy to Stimulant: Evaluation of Antifungal Potential Reveals Diversity in Phytoalexin Allicin Content among Garlic Cultivars; Allicin Containing Aqueous Garlic Extracts Trigger Antioxidants in Cucumber. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7.

HAYS, Stephanie G, PATRICK, William G, ZIESACK, Marika, OXMAN, Neri et SILVER, Pamela A, 2015. Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Current Opinion in Biotechnology*. 1 décembre 2015. Vol. 36, pp. 40-49. DOI 10.1016/j.copbio.2015.08.008.

HENNESSY, Rosanna C., PHIPPEN, Christopher B. W., NIELSEN, Kristian F., OLSSON, Stefan et STOUGAARD, Peter, 2017. Biosynthesis of the antimicrobial cyclic lipopeptides nunamycin and nunapeptin by *Pseudomonas fluorescens* strain In5 is regulated by the LuxR-type transcriptional regulator NunF. *MicrobiologyOpen*. 2017. Vol. 6, n° 6, pp. e00516. DOI 10.1002/mbo3.516.

- HERNANDEZ, Dennis, DIAS, Fiona M. et ROWE, John J., 1991. Nitrate transport and its regulation by O₂ in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1 avril 1991. Vol. 286, n° 1, pp. 159-163. DOI 10.1016/0003-9861(91)90022-B.
- HERVE-JIMENEZ, Luciana, GUILLOUARD, Isabelle, GUEDON, Eric, BOUDEBBOUZE, Samira, HOLS, Pascal, MONNET, Véronique, MAGUIN, Emmanuelle et RUL, Françoise, 2009. Postgenomic Analysis of *Streptococcus thermophilus* Cocultivated in Milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. avril 2009. Vol. 75, n° 7, pp. 2062-2073. DOI 10.1128/AEM.01984-08.
- HIBBETT, David, ABARENKOV, Kessy, KÕLJALG, Urmas, ÕPIK, Maarja, CHAI, Benli, COLE, James, WANG, Qiong, CROUS, Pedro, ROBERT, Vincent, HELGASON, Thorunn, HERR, Joshua R., KIRK, Paul, LUESCHOW, Shiloh, O'DONNELL, Kerry, NILSSON, R. Henrik, OONO, Ryoko, SCHOCH, Conrad, SMYTH, Christopher, WALKER, Donald M., PORRAS-ALFARO, Andrea, TAYLOR, John W. et GEISER, David M., 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*. 1 novembre 2016. Vol. 108, n° 6, pp. 1049-1068. DOI 10.3852/16-130.
- HOBBS, Glyn, FRAZER, Catherine M., GARDNER, David C. J., FLETT, Fiona et OLIVER, Stephen G.YR, 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *Microbiology*. 1990. Vol. 136, n° 11, pp. 2291-2296. DOI 10.1099/00221287-136-11-2291.
- HOU, Lukuan, LIU, Zengzhi, YU, Dongqi, LI, Huayue, JU, Jianhua et LI, Wenli, 2020. Targeted isolation of new polycyclic tetramate macrolactams from the deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66. *Bioorganic Chemistry*. 1 août 2020. Vol. 101, pp. 103954. DOI 10.1016/j.bioorg.2020.103954.
- HOUBRAKEN, J. et SAMSON, R.A., 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*. 1 septembre 2011. Vol. 70, n° 1, pp. 1-51. DOI 10.3114/sim.2011.70.01.
- HOWARTH, William R., TEWARI, Ram P. et SOLOTOROVSKY, Morris, 1975. Comparative In Vitro Antifungal Activity of Amphotericin B and Amphotericin B Methyl Ester. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. janvier 1975. DOI 10.1128/AAC.7.1.58.
- HOWELL, C. R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*. janvier 2003. Vol. 87, n° 1, pp. 4-10. DOI 10.1094/PDIS.2003.87.1.4.
- HUANG, Chien-Jui, WANG, Tang-Kai, CHUNG, Shu-Chun et CHEN, Chao-Ying, 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 31 janvier 2005. Vol. 38, n° 1, pp. 82-88. DOI 10.5483/bmbrep.2005.38.1.082.
- IBRAHIMI, Manar, KORICHI, Wassila, HAFIDI, Mohamed, LEMEE, Laurent, OUHDOUCH, Yedir et LOQMAN, Souad, 2020. Marine Actinobacteria: Screening for Predation Leads to the Discovery of Potential New Drugs against Multidrug-Resistant Bacteria. *Antibiotics*. février 2020. Vol. 9, n° 2, pp. 91. DOI 10.3390/antibiotics9020091.

INRAE, ANSES, et ARVALIS, 2022. Gestion des résistances - Fongicides sur céréales à paille : Note commune INRAE / ANSES / ARVALIS 2022. *ARVALIS*. 2022.

INRAE et IFREMER, 2022. Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques. *INRAE Institutionnel*. 2022.

INSERM, 2021. Pesticides et santé – Nouvelles données (2021) · Inserm, La science pour la santé. *Inserm*. 2021.

ISHII, Hideo, 2006. Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*. 2006. Vol. 40, n° 3, pp. 205-211. DOI 10.6090/jarq.40.205.

ISMAN, Murray B, 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 12 septembre 2000. Vol. 19, n° 8, pp. 603-608. DOI 10.1016/S0261-2194(00)00079-X.

JAHANSHIR, Amini et FEVZI, Sidovich Dzhililov, 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*. 23 juin 2010. Vol. 50, n° 2, pp. 172-178.

JAIZME-VEGA, María del Carmen, RODRÍGUEZ-ROMERO, Ana Sue et NÚÑEZ, Luis Antonio Barroso, 2006. Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Fruits*. mai 2006. Vol. 61, n° 3, pp. 151-162. DOI 10.1051/fruits:2006013.

JANSEN, Roman, KÜSTERS, Kira, MORSCHEIT, Holger, WIECHERT, Wolfgang et OLDIGES, Marco, 2021. A fully automated pipeline for the dynamic at-line morphology analysis of microscale *Aspergillus* cultivation. *Fungal Biology and Biotechnology*. 6 mars 2021. Vol. 8, n° 1, pp. 2. DOI 10.1186/s40694-021-00109-4.

JARMUSCH, Scott A., LAGOS-SUSAETA, Diego, DIAB, Emtinan, SALAZAR, Oriana, ASENJO, Juan A., EBEL, Rainer et JASPARS, Marcel, 2021. Iron-mediated fungal starvation by lupine rhizosphere-associated and extremotolerant *Streptomyces* sp. S29 desferrioxamine production. *Molecular Omics*. 22 février 2021. Vol. 17, n° 1, pp. 95-107. DOI 10.1039/D0MO00084A.

JEFFRIES, Peter, 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany*. 31 décembre 1995. Vol. 73, n° S1, pp. 1284-1290. DOI 10.1139/b95-389.

JENUL, Christian, SIEBER, Simon, DAEPPEN, Christophe, MATHEW, Anugraha, LARDI, Martina, PESSI, Gabriella, HOEPFNER, Dominic, NEUBURGER, Markus, LINDEN, Anthony, GADEMANN, Karl et EBERL, Leo, 2018. Biosynthesis of fragin is controlled by a novel quorum sensing signal. *Nature Communications*. 30 mars 2018. Vol. 9, n° 1, pp. 1297. DOI 10.1038/s41467-018-03690-2.

JHA, B. K., PRAGASH, M. G., CLETUS, J., RAMAN, Gurusamy et SAKTHIVEL, Natarajan, 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2009. Vol. 25, n° 4, pp. 573-581.

JIMENEZ-QUERO, A., POLLET, E., ZHAO, M., MARCHIONI, E., AVEROUS, L. et PHALIP, V., 2016. Itaconic and Fumaric Acid Production from Biomass Hydrolysates by *Aspergillus* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 26, n° 9, pp. 1557-1565. DOI 10.4014/jmb.1603.03073.

JIN, Young Hun, LEE, Junsu, PAWLUK, Alixander Mattay et MAH, Jae-Hyung, 2022. Inhibitory effects of nicotinic acid, glycine, and other food additives on biogenic amine formation in Baechu kimchi fermentation. *LWT*. 1 février 2022. Vol. 155, pp. 112921. DOI 10.1016/j.lwt.2021.112921.

JINDO, Keiji, OLIVARES, Fábio Lopes, MALCHER, Deyse Jacqueline da Paixão, SÁNCHEZ-MONEDERO, Miguel Angel, KEMPENAAR, Corné et CANELLAS, Luciano Pasqualoto, 2020. From Lab to Field: Role of Humic Substances Under Open-Field and Greenhouse Conditions as Biostimulant and Biocontrol Agent. *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11.

JOG, Rahul, PANDYA, Maharshi, NARESHKUMAR, G. et RAJKUMAR, Shalini, 2014. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology (Reading, England)*. avril 2014. Vol. 160, n° Pt 4, pp. 778-788. DOI 10.1099/mic.0.074146-0.

JOHNSTON, Trevor G., YUAN, Shuo-Fu, WAGNER, James M., YI, Xiunan, SAHA, Abhijit, SMITH, Patrick, NELSON, Alshakim et ALPER, Hal S., 2020. Compartmentalized microbes and co-cultures in hydrogels for on-demand bioproduction and preservation. *Nature Communications*. 4 février 2020. Vol. 11, n° 1, pp. 563. DOI 10.1038/s41467-020-14371-4.

KAI, Marco, HAUSTEIN, Maria, MOLINA, Francia, PETRI, Anja, SCHOLZ, Birte et PIECHULLA, Birgit, 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 janvier 2009. Vol. 81, n° 6, pp. 1001-1012. DOI 10.1007/s00253-008-1760-3.

KÄMPFER, Peter, 2015. *Streptomyces*. In : *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1-414. ISBN 978-1-118-96060-8.

KANEHISA, Minoru et GOTO, Susumu, 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. 1 janvier 2000. Vol. 28, n° 1, pp. 27-30.

KARUPPIAH, Valliappan, VALLIKKANNU, Murugappan, LI, Tingting et CHEN, Jie, 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. *Microbial Cell Factories*. 29 octobre 2019. Vol. 18, n° 1, pp. 185. DOI 10.1186/s12934-019-1233-7.

KATHIRAVAN, Muthu K., SALAKE, Amol B., CHOTHE, Aparna S., DUDHE, Prashik B., WATODE, Rahul P., MUKTA, Maheshwar S. et GADHWE, Sandeep, 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1 octobre 2012. Vol. 20, n° 19, pp. 5678-5698. DOI 10.1016/j.bmc.2012.04.045.

KATO, Souichiro, HARUTA, Shin, CUI, Zong Jun, ISHII, Masaharu et IGARASHI, Yasuo, 2005. Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Cellulose-Degrading Community.

Applied and Environmental Microbiology. novembre 2005. Vol. 71, n° 11, pp. 7099-7106. DOI 10.1128/AEM.71.11.7099-7106.2005.

KAUR, Talwinder et MANHAS, Rajesh Kumari, 2014. Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. *Journal of Basic Microbiology*. novembre 2014. Vol. 54, n° 11, pp. 1175-1185. DOI 10.1002/jobm.201300086.

KAWASE, Tomokazu, YOKOKAWA, Shinya, SAITO, Akihiro, FUJII, Takeshi, NIKAIDOU, Naoki, MIYASHITA, Kiyotaka et WATANABE, Takeshi, 2006. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. avril 2006. Vol. 70, n° 4, pp. 988-998. DOI 10.1271/bbb.70.988.

KEGLER, Carsten, NOLLMANN, Friederike I., AHRENDT, Tilman, FLEISCHHACKER, Florian, BODE, Edna et BODE, Helge B., 2014. Rapid Determination of the Amino Acid Configuration of Xenotetrapeptide. *ChemBioChem*. 2014. Vol. 15, n° 6, pp. 826-828. DOI 10.1002/cbic.201300602.

KESWANI, Chetan, SINGH, Harikesh B., GARCÍA-ESTRADA, Carlos, CARADUS, John, HE, Ya-Wen, MEZAACHE-AICHOOR, Samia, GLARE, Travis R., BORRIS, Rainer et SANSINENEA, Estibaliz, 2020. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 février 2020. Vol. 104, n° 3, pp. 1013-1034. DOI 10.1007/s00253-019-10300-8.

KHAMNA, Sutthinan, YOKOTA, Akira et LUMYONG, Saisamorn, 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World journal of microbiology & biotechnology*. 2009.

KHAN, Iqra Haider et JAVAID, Arshad, 2021. In vitro screening of *Aspergillus* spp. for their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Pathology*. 1 novembre 2021. Vol. 103, n° 4, pp. 1195-1205. DOI 10.1007/s42161-021-00865-7.

KHAN, Noor, MARTÍNEZ-HIDALGO, Pilar, ICE, Tyler A., MAYMON, Maskit, HUMM, Ethan A., NEJAT, Najmeh, SANDERS, Erin R., KAPLAN, Drora et HIRSCH, Ann M., 2018. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9, pp. 2363. DOI 10.3389/fmicb.2018.02363.

KHAN, Rahim, GHAZALI, Farinazleen Mohamad, MAHYUDIN, Nor Ainy et SAMSUDIN, Nik Iskandar Putra, 2021. Co-Inoculation of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic Strains of *Aspergillus flavus* to Assess the Efficacy of Non-Aflatoxigenic Strains in Growth Inhibition and Aflatoxin B1 Reduction. *Agriculture*. mars 2021. Vol. 11, n° 3, pp. 198. DOI 10.3390/agriculture11030198.

KHAN, Raja Asad Ali, NAJEEB, Saba, HUSSAIN, Shaukat, XIE, Bingyan et LI, Yan, 2020. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*. juin 2020. Vol. 8, n° 6, pp. 817. DOI 10.3390/microorganisms8060817.

KHARE, Ekta et ARORA, Naveen Kumar, 2010. Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in Suppression of Charcoal Rot Disease of Chickpea.

Current Microbiology. 1 juillet 2010. Vol. 61, n° 1, pp. 64-68. DOI 10.1007/s00284-009-9577-6.

KIM, Jeong Do, HAN, Jae Woo, HWANG, In Cheon, LEE, Dongho et KIM, Beom Seok, 2012. Identification and biocontrol efficacy of *Streptomyces miharaensis* producing filipin III against Fusarium wilt. *Journal of Basic Microbiology*. avril 2012. Vol. 52, n° 2, pp. 150-159. DOI 10.1002/jobm.201100134.

KITAMOTO, Hiroko, 2019. The phylloplane yeast *Pseudozyma*: a rich potential for biotechnology. *FEMS yeast research*. 1 août 2019. Vol. 19, n° 5, pp. foz053. DOI 10.1093/femsyr/foz053.

KJÆRBØLLING, Inge, VESTH, Tammi, FRISVAD, Jens C., NYBO, Jane L., THEOBALD, Sebastian, KILDGAARD, Sara, PETERSEN, Thomas Isbrandt, KUO, Alan, SATO, Atsushi, LYHNE, Ellen K., KOGLE, Martin E., WIEBENGA, Ad, KUN, Roland S., LUBBERS, Ronnie J. M., MÄKELÄ, Miia R., BARRY, Kerrie, CHOVIATIA, Mansi, CLUM, Alicia, DAUM, Chris, HARIDAS, Sajeet, HE, Guifen, LABUTTI, Kurt, LIPZEN, Anna, MONDO, Stephen, PANGILINAN, Jasmyn, RILEY, Robert, SALAMOV, Asaf, SIMMONS, Blake A., MAGNUSON, Jon K., HENRISSAT, Bernard, MORTENSEN, Uffe H., LARSEN, Thomas O., DE VRIES, Ronald P., GRIGORIEV, Igor V., MACHIDA, Masayuki, BAKER, Scott E. et ANDERSEN, Mikael R., 2020. A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section *Flavi*. *Nature Communications*. 27 février 2020. Vol. 11, n° 1, pp. 1106. DOI 10.1038/s41467-019-14051-y.

KLITGORD, Niels et SEGRÈ, Daniel, 2010. Environments that Induce Synthetic Microbial Ecosystems. *PLOS Computational Biology*. 18 novembre 2010. Vol. 6, n° 11, pp. e1001002. DOI 10.1371/journal.pcbi.1001002.

KNOWLES, Sonja, RAJA, Huzefa, ROBERTS, Christopher et OBERLIES, Nicholas, 2022. Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. *Natural Product Reports*. 2022. Vol. 39, n° 8, pp. 1557-1573. DOI 10.1039/D1NP00070E.

KOCHE, M. D., GADE, R. M. et DESHMUKH, A. G., 2012. Antifungal activity of secondary metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Pesticide Research Journal*. 2012. Vol. 24, n° 1, pp. 21-24.

KOLSTØ, Anne-Brit, TOURASSE, Nicolas J et ØKSTAD, Ole Andreas, 2009. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species. *Annual review of microbiology*. 1 janvier 2009. Vol. 63, pp. 451-476. DOI 10.1146/annurev.micro.091208.073255.

KÖNIG, Helmut et FRÖHLICH, Jürgen, 2017. Lactic Acid Bacteria. In : KÖNIG, Helmut, UNDEN, Gottfried et FRÖHLICH, Jürgen (éd.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Cham : Springer International Publishing. pp. 3-41. ISBN 978-3-319-60021-5.

KORDEL, M., SCHÜLLER, F. et SAHL, H. G., 1989. Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. *FEBS letters*. 13 février 1989. Vol. 244, n° 1, pp. 99-102. DOI 10.1016/0014-5793(89)81171-8.

KRAHN, Daniel, OTTMANN, Christian et KAISER, Markus, 2011. The chemistry and biology of syringolins, glidobactins and cepafungins (syrbactins). *Natural Product Reports*. 18 octobre 2011. Vol. 28, n° 11, pp. 1854-1867. DOI 10.1039/C1NP00048A.

KRÜGEL, Hans, KRUBASIK, Philipp, WEBER, Kerstin, SALUZ, Hans Peter et SANDMANN, Gerhard, 1999. Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 9 juillet 1999. Vol. 1439, n° 1, pp. 57-64. DOI 10.1016/S1388-1981(99)00075-X.

KRZYZANIAK, Yuko, MAGNIN-ROBERT, Maryline, RANDOUX, Béatrice, FONTAINE, Joël et LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, Anissa, 2021. Combined Use of Beneficial Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi for the Biocontrol of Plant Cryptogamic Diseases: Evidence, Methodology, and Limits. In : SHRIVASTAVA, Neeraj, MAHAJAN, Shubhangi et VARMA, Ajit (éd.), *Symbiotic Soil Microorganisms: Biology and Applications*. Cham : Springer International Publishing. pp. 429-468. Soil Biology. ISBN 978-3-030-51916-2.

KUMAR, R. Sunish, AYYADURAI, N., PANDIARAJA, P., REDDY, A. V., VENKATESWARLU, Y., PRAKASH, O. et SAKTHIVEL, N., 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 98, n° 1, pp. 145-154. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02435.x.

LARKIN, Robert P., 2016. Impacts of biocontrol products on *Rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities, and their persistence in soil. *Crop Protection*. 1 décembre 2016. Vol. 90, pp. 96-105. DOI 10.1016/j.cropro.2016.08.012.

LAVERMICOCCA, Paola, VALERIO, Francesca et VISCONTI, Angelo, 2003. Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. *Applied and Environmental Microbiology*. janvier 2003. Vol. 69, n° 1, pp. 634-640. DOI 10.1128/AEM.69.1.634-640.2003.

LE GOFF, Géraldine et OUZZANI, Jamal, 2014. Natural hydrazine-containing compounds: Biosynthesis, isolation, biological activities and synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1 décembre 2014. Vol. 22, n° 23, pp. 6529-6544. DOI 10.1016/j.bmc.2014.10.011.

LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSEN, I. et MUNDY, J., 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *Journal of Biological Chemistry*. 25 janvier 1991. Vol. 266, n° 3, pp. 1564-1573. DOI 10.1016/S0021-9258(18)52331-0.

LEE, Hyun Jung et RYU, Dojin, 2017. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23 août 2017. Vol. 65, n° 33, pp. 7034-7051. DOI 10.1021/acs.jafc.6b04847.

LEE, Minji, CHO, Jeong-Yong, LEE, Yu Geon, LEE, Hyoung Jae, LIM, Seong-Il, LEE, So-Young, NAM, Young-Do et MOON, Jae-Hak, 2016. Furan, phenolic, and heptelidic acid derivatives produced by *Aspergillus oryzae*. *Food Science and Biotechnology*. 31 octobre 2016. Vol. 25, n° 5, pp. 1259-1264. DOI 10.1007/s10068-016-0199-z.

LEROUX, Pierre, 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies*. 1 janvier 2003. Vol. 326, n° 1, pp. 9-21. DOI 10.1016/S1631-0691(03)00005-2.

- LESLIE, John F. et SUMMERELL, Brett A., 2008. *The Fusarium Laboratory Manual*. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-27646-4.
- LI, Chaofeng, JI, Chenming et TANG, Boping, 2018. Purification, characterisation and biological activity of melanin from *Streptomyces* sp. *FEMS Microbiology Letters*. 1 octobre 2018. Vol. 365, n° 19, pp. fny077. DOI 10.1093/femsle/fny077.
- LI, Ling, LI, Zheng, WANG, Kailiang, LIU, Yuxiu, LI, Yongqiang et WANG, Qingmin, 2016. Synthesis and antiviral, insecticidal, and fungicidal activities of gossypol derivatives containing alkylimine, oxime or hydrazine moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1 février 2016. Vol. 24, n° 3, pp. 474-483. DOI 10.1016/j.bmc.2015.08.015.
- LI, Tingting, TANG, Jiaquan, KARUPPIAH, Valliappan, LI, Yaqian, XU, Nan et CHEN, Jie, 2020. Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biological Control*. 1 janvier 2020. Vol. 140, pp. 104122. DOI 10.1016/j.biocontrol.2019.104122.
- LI, Wenfeng, CSUKAI, Michael, CORRAN, Andrew, CROWLEY, Patrick, SOLOMON, Peter S. et OLIVER, Richard P., 2008. Malayamycin, a new streptomycete antifungal compound, specifically inhibits sporulation of *Stagonospora nodorum* (Berk) Castell and Germano, the cause of wheat glume blotch disease. *Pest Management Science*. décembre 2008. Vol. 64, n° 12, pp. 1294-1302. DOI 10.1002/ps.1632.
- LI, Xiao-Jun, ZHANG, Qiang, ZHANG, An-Ling et GAO, Jin-Ming, 2012. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an Endophytic Fungus Associated with *Melia azedarach*, and Their Antifungal, Antifeedant, and Toxic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4 avril 2012. Vol. 60, n° 13, pp. 3424-3431. DOI 10.1021/jf300146n.
- LI, Zaifeng, WU, Zengru et LUO, Fuying, 2005. Synthesis and Antifungal Activities of Alkyl N-(1,2,3-Thiadiazole-4-Carbonyl) Carbamates and S-Alkyl N-(1,2,3-Thiadiazole-4-Carbonyl) Carbamothioates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 mai 2005. Vol. 53, n° 10, pp. 3872-3876. DOI 10.1021/jf0501746.
- LICYAYO, Dinah Corazon M., SUZUKI, Akira et MATSUMOTO, Masahiro, 2007. Interactions among ammonia fungi on MY agar medium with varying pH. *Mycoscience*. 1 janvier 2007. Vol. 48, n° 1, pp. 20-28. DOI 10.1007/S10267-006-0323-7.
- LINARES-MORALES, José R., GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, Néstor, RIVERA-CHAVIRA, Blanca E., PÉREZ-VEGA, Samuel B. et NEVÁREZ-MOORILLÓN, Guadalupe V., 2018. Biocontrol Processes in Fruits and Fresh Produce, the Use of Lactic Acid Bacteria as a Sustainable Option. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2018. Vol. 2.
- LIU, Chao et KAKEYA, Hideaki, 2020. Cryptic Chemical Communication: Secondary Metabolic Responses Revealed by Microbial Co-culture. *Chemistry – An Asian Journal*. 2020. Vol. 15, n° 3, pp. 327-337. DOI 10.1002/asia.201901505.
- LIU, Shaowei, WANG, Ting, LU, Qinpei, LI, Feina, WU, Gang, JIANG, Zhongke, HABDEN, Xugela, LIU, Lin, ZHANG, Xiaolin, LUKIANOV, Dmitry A., OSTERMAN, Ilya A., SERGIEV, Petr V., DONTSOVA, Olga A. et SUN, Chenghang, 2021. Bioprospecting of Soil-Derived Actinobacteria Along the Alar-Hotan Desert Highway in the Taklamakan Desert. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12.

LIU, Shuai, DAI, Haofu, HEERING, Christian, JANIÁK, Christoph, LIN, Wenhan, LIU, Zhen et PROKSCH, Peter, 2017. Inducing new secondary metabolites through co-cultivation of the fungus *Pestalotiopsis* sp. with the bacterium *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron Letters*. 18 janvier 2017. Vol. 58, n° 3, pp. 257-261. DOI 10.1016/j.tetlet.2016.12.026.

LOGAN, Niall A. et VOS, Paul De, 2015. *Bacillus*. In : *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1-163. ISBN 978-1-118-96060-8.

LORINCZ, Z., PREININGER, E., KÓSA, A., PÓNYI, T., NYITRAI, P., SARKADI, L., KOVÁCS, G. M., BÖDDI, B. et GYURJÁN, I., 2010. Artificial tripartite symbiosis involving a green alga (*Chlamydomonas*), a bacterium (*Azotobacter*) and a fungus (*Alternaria*): morphological and physiological characterization. *Folia Microbiologica*. juillet 2010. Vol. 55, n° 4, pp. 393-400. DOI 10.1007/s12223-010-0067-9.

LUO, Yunzi, HUANG, Hua, LIANG, Jing, WANG, Meng, LU, Lu, SHAO, Zengyi, COBB, Ryan E. et ZHAO, Huimin, 2013. Activation and Characterization of a Cryptic Polycyclic Tetramate Macrolactam Biosynthetic Gene Cluster. *Nature communications*. 2013. Vol. 4, pp. 2894. DOI 10.1038/ncomms3894.

LV, Quan-Zhen, NI, Ting-Jun-Hong, LI, Li-Ping, LI, Tian, ZHANG, Da-Zhi et JIANG, Yuan-Ying, 2020. A New Antifungal Agent (4-phenyl-1, 3-thiazol-2-yl) Hydrazine Induces Oxidative Damage in *Candida albicans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020. Vol. 10.

LYNCH, K.m., ZANNINI, E., GUO, J., AXEL, C., ARENDT, E.k., KILDEA, S. et COFFEY, A., 2016. Control of *Zymoseptoria tritici* cause of septoria tritici blotch of wheat using antifungal *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2016. Vol. 121, n° 2, pp. 485-494. DOI 10.1111/jam.13171.

LYONS, A Bruce, 1999. Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology & Cell Biology*. 1999. Vol. 77, n° 6, pp. 509-515. DOI 10.1046/j.1440-1711.1999.00864.x.

MA, Li-Jun, GEISER, David M., PROCTOR, Robert H., ROONEY, Alejandro P., O'DONNELL, Kerry, TRAIL, Frances, GARDINER, Donald M., MANNERS, John M. et KAZAN, Kemal, 2013. *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*. 2013. Vol. 67, pp. 399-416. DOI 10.1146/annurev-micro-092412-155650.

MACHIDA, Masayuki, ASAI, Kiyoshi, SANO, Motoaki, TANAKA, Toshihiro, KUMAGAI, Toshitaka, TERAÍ, Goro, KUSUMOTO, Ken-Ichi, ARIMA, Toshihide, AKITA, Osamu, KASHIWAGI, Yutaka, ABE, Keietsu, GOMI, Katsuya, HORIUCHI, Hiroyuki, KITAMOTO, Katsuhiko, KOBAYASHI, Tetsuo, TAKEUCHI, Michio, DENNING, David W., GALAGAN, James E., NIERMAN, William C., YU, Jiujiang, ARCHER, David B., BENNETT, Joan W., BHATNAGAR, Deepak, CLEVELAND, Thomas E., FEDOROVA, Natalie D., GOTOH, Osamu, HORIKAWA, Hiroshi, HOSOYAMA, Akira, ICHINOMIYA, Masayuki, IGARASHI, Rie, IWASHITA, Kazuhiro, JUVVADI, Praveen Rao, KATO, Masashi, KATO, Yumiko, KIN, Taishin, KOKUBUN, Akira, MAEDA, Hiroshi, MAEYAMA, Noriko, MARUYAMA, Jun-ichi, NAGASAKI, Hideki, NAKAJIMA, Tasuku, ODA, Ken, OKADA, Kinya, PAULSEN, Ian, SAKAMOTO, Kazutoshi, SAWANO, Toshihiko, TAKAHASHI, Mikio, TAKASE, Kumiko, TERABAYASHI, Yasunobu, WORTMAN, Jennifer R., YAMADA, Osamu, YAMAGATA, Youhei, ANAZAWA, Hideharu, HATA, Yoji, KOIDE, Yoshinao, KOMORI, Takashi, KOYAMA, Yasuji, MINETOKI, Toshitaka, SUHARNAN, Sivasundaram,

- TANAKA, Akimitsu, ISONO, Katsumi, KUHARA, Satoru, OGASAWARA, Naotake et KIKUCHI, Hisashi, 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. décembre 2005. Vol. 438, n° 7071, pp. 1157-1161. DOI 10.1038/nature04300.
- MAGDOULI, S., BRAR, S. K. et BLAIS, J. F., 2016. Co-culture for lipid production: Advances and challenges. *Biomass and Bioenergy*. 1 septembre 2016. Vol. 92, pp. 20-30. DOI 10.1016/j.biombioe.2016.06.003.
- MAGET-DANA, R., THIMON, L., PEYPOUX, F. et PTAK, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*. 1 décembre 1992. Vol. 74, n° 12, pp. 1047-1051. DOI 10.1016/0300-9084(92)90002-V.
- MAGET-DANA, Régine et PEYPOUX, Françoise, 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*. 28 février 1994. Vol. 87, n° 1, pp. 151-174. DOI 10.1016/0300-483X(94)90159-7.
- MAGIE, R. O. et WILFRET, G. J., 1974. Tolerance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* to benzimidazole fungicides. *Plant disease reporter*. 1974.
- MAGNUSSON, Jesper, STRÖM, Katrin, ROOS, Stefan, SJÖGREN, Jörgen et SCHNÜRER, Johan, 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1 février 2003. Vol. 219, n° 1, pp. 129-135. DOI 10.1016/S0378-1097(02)01207-7.
- MAIMONE, Naydja Moralles, DE OLIVEIRA, Lucianne Ferreira Paes, SANTOS, Suikinai Nobre et DE LIRA, Simone Possedente, 2021. Elicitation of *Streptomyces lunalinharesii* secondary metabolism through co-cultivation with *Rhizoctonia solani*. *Microbiological Research*. 1 octobre 2021. Vol. 251, pp. 126836. DOI 10.1016/j.micres.2021.126836.
- MAISSA, Ben Jabeur et WALID, Hamada, 2015. Antifungal activity of chemically different essential oils from wild Tunisian *Thymus* spp. *Natural Product Research*. 3 mai 2015. Vol. 29, n° 9, pp. 869-873. DOI 10.1080/14786419.2014.984182.
- MAKSIMOV, Mikhail O et LINK, A James, 2014. Prospecting genomes for lasso peptides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1 février 2014. Vol. 41, n° 2, pp. 333-344. DOI 10.1007/s10295-013-1357-4.
- MARKOVICH, N. A. et KONONOVA, G. L., 2003. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 1 juillet 2003. Vol. 39, n° 4, pp. 341-351. DOI 10.1023/A:1024502431592.
- MATARESE, F., SARROCCO, S., GRUBER, S., SEIDL-SEIBOTH, V. et VANNACCI, G., 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology (Reading, England)*. janvier 2012. Vol. 158, n° Pt 1, pp. 98-106. DOI 10.1099/mic.0.052639-0.
- MATSUDA, Kenichi, TOMITA, Takeo, SHIN-YA, Kazuo, WAKIMOTO, Toshiyuki, KUZUYAMA, Tomohisa et NISHIYAMA, Makoto, 2018. Discovery of Unprecedented Hydrazine-Forming Machinery in Bacteria. *Journal of the American Chemical Society*. 25 juillet 2018. Vol. 140, n° 29, pp. 9083-9086. DOI 10.1021/jacs.8b05354.

- MEE, Michael T., COLLINS, James J., CHURCH, George M. et WANG, Harris H., 2014. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 20 mai 2014. Vol. 111, n° 20, pp. E2149-E2156. DOI 10.1073/pnas.1405641111.
- MEENAMBIGA, S. S. et RAJAGOPAL, K., 2018. Antibiofilm activity and molecular docking studies of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Aspergillus nidulans* on oral *Candida albicans*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018. Vol. 8, n° 3, pp. 37-45. DOI 10.7324/JAPS.2018.8306.
- MEJRI, Samara, SIAH, Ali, COUTTE, François, MAGNIN-ROBERT, Maryline, RANDOUX, Béatrice, TISSERANT, Benoit, KRIER, François, JACQUES, Philippe, REIGNAULT, Philippe et HALAMA, Patrice, 2018. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Pollution Research International*. octobre 2018. Vol. 25, n° 30, pp. 29822-29833. DOI 10.1007/s11356-017-9241-9.
- MELLEFONT, L. A., MCMEEKIN, T. A. et ROSS, T., 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*. 31 janvier 2008. Vol. 121, n° 2, pp. 157-168. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.010.
- MEWES, H. W., FRISHMAN, D., GÜLDENER, U., MANNHAUPT, G., MAYER, K., MOKREJS, M., MORGENSTERN, B., MÜNSTERKÖTTER, M., RUDD, S. et WEIL, B., 2002. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Research*. 1 janvier 2002. Vol. 30, n° 1, pp. 31-34.
- MIAO, Li, KWONG, Theresa F. N. et QIAN, Pei-Yuan, 2006. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrimum* c.f. *saccharicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 octobre 2006. Vol. 72, n° 5, pp. 1063-1073. DOI 10.1007/s00253-006-0376-8.
- MIAO, Vivian, BROST, Renee, CHAPPLE, Joanne, SHE, Kevin, GAL, Marie-François Coëffet-Le et BALTZ, Richard H, 2006. The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1 février 2006. Vol. 33, n° 2, pp. 129-140. DOI 10.1007/s10295-005-0028-5.
- MICHELSEN, Charlotte F., JENSEN, Helle, VENDITTO, Vincent J., HENNESSY, Rosanna C. et STOUGAARD, Peter, 2015. Bioactivities by a crude extract from the Greenlandic *Pseudomonas* sp. In5 involves the nonribosomal peptides, nunamycin and nunapeptin. *PeerJ*. 2015. Vol. 3, pp. e1476. DOI 10.7717/peerj.1476.
- MILLER, C. M., MILLER, R. V., GARTON-KENNY, D., REDGRAVE, B., SEARS, J., CONDRON, M. M., TEPLow, D. B. et STROBEL, G. A., 1998. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of Applied Microbiology*. juin 1998. Vol. 84, n° 6, pp. 937-944. DOI 10.1046/j.1365-2672.1998.00415.x.
- MIMEE, Benjamin, LABBÉ, Caroline, PELLETIER, René et BÉLANGER, Richard R., 2005. Antifungal Activity of Flocculosin, a Novel Glycolipid Isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. avril 2005. Vol. 49, n° 4, pp. 1597-1599. DOI 10.1128/AAC.49.4.1597-1599.2005.

MINGMA, Ratchanee et DUANGMAL, Kannika, 2018. Characterization, Antifungal Activity and Plant Growth Promoting Potential of Endophytic Actinomycetes Isolated from Rice (*Oryza sativa* L.). 2018.

MISHRA, Sakshi, SRIVASTAVA, Sonal, DEWANGAN, Jayant, DIVAKAR, Aman et KUMAR RATH, Srikanta, 2020. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 27 avril 2020. Vol. 60, n° 8, pp. 1346-1374. DOI 10.1080/10408398.2019.1571479.

MOORE, Geromy G., LEBAR, Matthew D., CARTER-WIENTJES, Carol H. et GILBERT, Matthew K., 2021. The potential role of fungal volatile organic compounds in *Aspergillus flavus* biocontrol efficacy. *Biological Control*. 1 septembre 2021. Vol. 160, pp. 104686. DOI 10.1016/j.biocontrol.2021.104686.

MOSCOVIZ, Roman, FLAYAC, Clément, DESMOND-LE QUÉMÉNER, Elie, TRABLY, Eric et BERNET, Nicolas, 2017. Revealing extracellular electron transfer mediated parasitism: energetic considerations. *Scientific Reports*. 10 août 2017. Vol. 7, n° 1, pp. 7766. DOI 10.1038/s41598-017-07593-y.

MOUSSA, Mariam, EBRAHIM, Weaam, BONUS, Michele, GOHLKE, Holger, MÁNDI, Attila, KURTÁN, Tibor, HARTMANN, Rudolf, KALSCHEUER, Rainer, LIN, Wenhan, LIU, Zhen et PROKSCH, Peter, 2019. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers. *RSC Advances*. 9 janvier 2019. Vol. 9, n° 3, pp. 1491-1500. DOI 10.1039/C8RA09067J.

MOUSSA, Mariam, EBRAHIM, Weaam, KALSCHEUER, Rainer, LIU, Zhen et PROKSCH, Peter, 2020. Co-culture of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* with the fungus *Fusarium tricinctum* induces bacterial antifungal and quorum sensing signaling molecules. *Phytochemistry Letters*. 1 avril 2020. Vol. 36, pp. 37-41. DOI 10.1016/j.phytol.2020.01.013.

MUHIALDIN, Belal J., HASSAN, Zaiton et SADON, Sajaa Kh, 2011. Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasi* D5 on selected foods. *Journal of Food Science*. septembre 2011. Vol. 76, n° 7, pp. M493-499. DOI 10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x.

MÜLLER, G, MATZANKE, B F et RAYMOND, K N, 1984. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *Journal of Bacteriology*. octobre 1984. Vol. 160, n° 1, pp. 313-318. DOI 10.1128/jb.160.1.313-318.1984.

MURATA, Daichi, SAWANO, Sayaka, OHIKE, Tatsuya, OKANAMI, Masahiro et ANO, Takashi, 2013. Isolation of antifungal bacteria from Japanese fermented soybeans, natto. *Journal of Environmental Sciences (China)*. décembre 2013. Vol. 25 Suppl 1, pp. S127-131. DOI 10.1016/S1001-0742(14)60641-0.

MURRAY, Patrick R., 2015. 16 - The Clinician and the Microbiology Laboratory. In : BENNETT, John E., DOLIN, Raphael et BLASER, Martin J. (éd.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. Philadelphia : W.B. Saunders. pp. 191-223. ISBN 978-1-4557-4801-3.

- NAGÓRSKA, Krzysztofa, BIKOWSKI, Mariusz et OBUCHOWSKI, Michał, 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*. 17 septembre 2007. Vol. 54, n° 3, pp. 495-508. DOI 10.18388/abp.2007_3224.
- NAKANO, Michiko M. et HULETT, F. Marion, 1997. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiology Letters*. 1 décembre 1997. Vol. 157, n° 1, pp. 1-7. DOI 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12744.x.
- NASUNO, S. et ASAI, T., 1962. Red pigment formation by interaction of molds part 4 interaction between *P. verruculosum* and various molds. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1962. Vol. 8, n° 1, pp. 29-38. DOI 10.2323/jgam.8.29. Scopus
- NAWANI, N.n., KAPADNIS, B.p., DAS, A.d., RAO, A.s. et MAHAJAN, S.k., 2002. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *Journal of Applied Microbiology*. 2002. Vol. 93, n° 6, pp. 965-975. DOI 10.1046/j.1365-2672.2002.01766.x.
- NELSON, P E, DIGNANI, M C et ANAISSIE, E J, 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*. octobre 1994. Vol. 7, n° 4, pp. 479-504. DOI 10.1128/CMR.7.4.479.
- NETZKER, Tina, FLAK, Michal, KRESPACH, Mario KC, STROE, Maria C, WEBER, Jakob, SCHROECKH, Volker et BRAKHAGE, Axel A, 2018. Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*. 1 octobre 2018. Vol. 45, pp. 117-123. DOI 10.1016/j.mib.2018.04.002.
- NEWTON, Adrian C., JOHNSON, Scott N. et GREGORY, Peter J., 2011. Implications of climate change for diseases, crop yields and food security. *Euphytica*. 1 mai 2011. Vol. 179, n° 1, pp. 3-18. DOI 10.1007/s10681-011-0359-4.
- NGUYEN, Phuong-Anh, STRUB, Caroline, LAGRÉE, Marie, BERTRAND-MICHEL, Justine, SCHORR-GALINDO, Sabine et FONTANA, Angélique, 2020. Study of in vitro interaction between *Fusarium verticillioides* and *Streptomyces* sp. using metabolomics. *Folia Microbiologica*. 1 avril 2020. Vol. 65, n° 2, pp. 303-314. DOI 10.1007/s12223-019-00725-z.
- NICHOLSON, W L, 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and molecular life sciences*. 1 mars 2002. Vol. 59, n° 3, pp. 410-416. DOI 10.1007/s00018-002-8433-7.
- NIEWIADOMSKA, A., 2004. Effect of Carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover [*Trifolium pratense* L.]. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2004. Vol. 13, n° 4.
- NOUT, M. J. Robert et AIDOO, Kofi E., 2011. Asian Fungal Fermented Food. In : HOFRICHTER, Martin (éd.), *Industrial Applications*. Berlin, Heidelberg : Springer. pp. 29-58. The Mycota. ISBN 978-3-642-11458-8.
- NYBROE, Ole et SØRENSEN, Jan, 2004. Production of Cyclic Lipopeptides by Fluorescent Pseudomonads. In : RAMOS, Juan-Luis (éd.), *Pseudomonas: Volume 3 Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Boston, MA : Springer US. pp. 147-172. ISBN 978-1-4419-9088-4.

- O'BRIEN, Philip A., 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*. 1 juillet 2017. Vol. 46, n° 4, pp. 293-304. DOI 10.1007/s13313-017-0481-4.
- OKKERS, DJ, DICKS, LM, SILVESTER, M, JOUBERT, JJ et ODENDAAL, HJ, 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of applied microbiology*. novembre 1999. Vol. 87, n° 5. DOI 10.1046/j.1365-2672.1999.00918.x.
- OLA, Antonius R. B., DEBBAB, Abdessamad, ALY, Amal H., MANDI, Attila, ZERFASS, Ilka, HAMACHER, Alexandra, KASSACK, Matthias U., BRÖTZ-OESTERHELT, Heike, KURTAN, Tibor et PROKSCH, Peter, 2014. Absolute configuration and antibiotic activity of neosartorin from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*. *Tetrahedron Letters*. 29 janvier 2014. Vol. 55, n° 5, pp. 1020-1023. DOI 10.1016/j.tetlet.2013.12.070.
- OLA, Antonius R. B., THOMY, Dhana, LAI, Daowan, BRÖTZ-OESTERHELT, Heike et PROKSCH, Peter, 2013. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*. 22 novembre 2013. Vol. 76, n° 11, pp. 2094-2099. DOI 10.1021/np400589h.
- OLIVAIN, Chantal et ALABOUVETTE, Claude, 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytologist*. 1999. Vol. 141, n° 3, pp. 497-510. DOI 10.1046/j.1469-8137.1999.00365.x.
- OLIVAIN, Chantal, TROUVELOT, Sophie, BINET, Marie-Noëlle, CORDIER, Christelle, PUGIN, Alain et ALABOUVETTE, Claude, 2003. Colonization of Flax Roots and Early Physiological Responses of Flax Cells Inoculated with Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology*. septembre 2003. DOI 10.1128/AEM.69.9.5453-5462.2003.
- OMURA, S., IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., TAKAHASHI, C., SHINOSE, M., TAKAHASHI, Y., HORIKAWA, H., NAKAZAWA, H., OSONOE, T., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y. et HATTORI, M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9 octobre 2001. Vol. 98, n° 21, pp. 12215-12220. DOI 10.1073/pnas.211433198.
- ONGENA, Marc et JACQUES, Philippe, 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 1 mars 2008. Vol. 16, n° 3, pp. 115-125. DOI 10.1016/j.tim.2007.12.009.
- ONGENA, Marc, JOURDAN, Emmanuel, ADAM, Akram, PAQUOT, Michel, BRANS, Alain, JORIS, Bernard, ARPIGNY, Jean-Louis et THONART, Philippe, 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 9, n° 4, pp. 1084-1090. DOI 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x.
- OUOBA, L.i.i., DIAWARA, B., JESPERSEN, L. et JAKOBSEN, M., 2007. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 102, n° 4, pp. 963-970. DOI 10.1111/j.1365-2672.2006.03156.x.

- PADMAPERUMA, Gloria, KAPOORE, Rahul Vijay, GILMOUR, Daniel James et VAIDYANATHAN, Seetharaman, 2018. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. *Critical Reviews in Biotechnology*. août 2018. Vol. 38, n° 5, pp. 690-703. DOI 10.1080/07388551.2017.1390728.
- PAL, K. K., TILAK, K. V. B. R., SAXENA, A. K., DEY, R. et SINGH, C. S., 2000. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. *Microbiological Research*. 1 septembre 2000. Vol. 155, n° 3, pp. 233-242. DOI 10.1016/S0944-5013(00)80038-5.
- PALACIOS, Irene, GUILLAMÓN, Eva, GARCÍA-LAFUENTE, Ana et VILLARES, Ana, 2014. Effects of Freeze-Drying Treatment on the Aromatic Profile of Tuber spp. Truffles. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014. Vol. 38, n° 3, pp. 768-773. DOI 10.1111/jfpp.12028.
- PALAZZINI, Juan M., RAMIREZ, Maria L., TORRES, Adriana M. et CHULZE, Sofia N., 2007. Potential biocontrol agents for Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection*. 1 novembre 2007. Vol. 26, n° 11, pp. 1702-1710. DOI 10.1016/j.cropro.2007.03.004.
- PALMIERI, Maria Cristina, PERAZZOLLI, Michele, MATAFORA, Vittoria, MORETTO, Marco, BACHI, Angela et PERTOT, Ilaria, 2012. Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. *Journal of Experimental Botany*. octobre 2012. Vol. 63, n° 17, pp. 6237-6251. DOI 10.1093/jxb/ers279.
- PANMANEE, Warunya et HASSETT, Daniel J., 2009. Differential roles of OxyR-controlled antioxidant enzymes alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF) and catalase (KatB) in the protection of *Pseudomonas aeruginosa* against hydrogen peroxide in biofilm vs. planktonic culture. *FEMS Microbiology Letters*. 1 juin 2009. Vol. 295, n° 2, pp. 238-244. DOI 10.1111/j.1574-6968.2009.01605.x.
- PARISOT, Judicaël, CAREY, Sarah, BREUKINK, Eefjan, CHAN, Weng C., NARBAD, Arjan et BONEV, Boyan, 2008. Molecular Mechanism of Target Recognition by Subtilin, a Class I Lanthionine Antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. février 2008. Vol. 52, n° 2, pp. 612-618. DOI 10.1128/AAC.00836-07.
- PARK, J. Y., OH, S. A., ANDERSON, A. J., NEISWENDER, J., KIM, J.-C. et KIM, Y. C., 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Letters in Applied Microbiology*. 1 mai 2011. Vol. 52, n° 5, pp. 532-537. DOI 10.1111/j.1472-765X.2011.03036.x.
- PARK, Jihyang, KERNER, Alissa, BURNS, Mark A. et LIN, Xiaoxia Nina, 2011. Microdroplet-enabled highly parallel co-cultivation of microbial communities. *PloS One*. 25 février 2011. Vol. 6, n° 2, pp. e17019. DOI 10.1371/journal.pone.0017019.
- PARRY, D. W., JENKINSON, P. et MCLEOD, L., 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*. 1995. Vol. 44, n° 2, pp. 207-238. DOI 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x.
- PAUL, Narayan Chandra, KIM, Won-Ki, WOO, Sung-Kyoon, PARK, Myung-Soo et YU, Seung-Hun, 2007. Fungal Endophytes in Roots of *Aralia* Species and Their Antifungal

Activity. *The Plant Pathology Journal*. 2007. Vol. 23, n° 4, pp. 287-294. DOI 10.5423/PPJ.2007.23.4.287.

PEIX, Alvaro, RAMÍREZ-BAHENA, Martha-Helena et VELÁZQUEZ, Encarna, 2018. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. 1 janvier 2018. Vol. 57, pp. 106-116. DOI 10.1016/j.meegid.2017.10.026.

PELTOLA, Joanna, RITIENI, Alberto, MIKKOLA, Raimo, GRIGORIEV, Pavel A., PÓCSFALVI, Gabriella, ANDERSSON, Maria A. et SALKINOJA-SALONEN, Mirja S., 2004. Biological Effects of *Trichoderma harzianum* Peptaibols on Mammalian Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. août 2004. Vol. 70, n° 8, pp. 4996-5004. DOI 10.1128/AEM.70.8.4996-5004.2004.

PENHA, Rafaela O., VANDENBERGHE, Luciana P. S., FAULDS, Craig, SOCCOL, Vanete T. et SOCCOL, Carlos R., 2020. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*. 21 février 2020. Vol. 251, n° 3, pp. 70. DOI 10.1007/s00425-020-03357-7.

PERAZZOLLI, Michele, ROATTI, Benedetta, BOZZA, Elisa et PERTOT, Ilaria, 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control*. 1 juillet 2011. Vol. 58, n° 1, pp. 74-82. DOI 10.1016/j.biocontrol.2011.04.006.

PESTKA, James J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*. 1 octobre 2007. Vol. 137, n° 3, pp. 283-298. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.006.

PEZET, R., PONT, V. et TABACCHI, R., 1999. Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochemical Analysis*. 1999. Vol. 10, n° 5, pp. 285-288. DOI 10.1002/(SICI)1099-1565(199909/10)10:5<285::AID-PCA466>3.0.CO;2-8.

PFEFFERLE, W., ANKE, H., BROSS, M., STEFFAN, B., VIANDEN, R. et STEGLICH, W., 1990. Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Antibiotics*. juin 1990. Vol. 43, n° 6, pp. 648-654. DOI 10.7164/antibiotics.43.648.

PINTO, Maria E. A., ARAÚJO, Sthéfane G., MORAIS, Marcela I., SÁ, Nívea P., LIMA, Caroline M., ROSA, Carlos A., SIQUEIRA, Ezequias P., JOHANN, Susana et LIMA, Luciana a. R. S., 2017. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 31 août 2017. Vol. 89, pp. 1671-1681. DOI 10.1590/0001-3765201720160908.

PITT, J. I. et HOCKING, A. D., 1985. Fungi and food spoilage. *Fungi and food spoilage*. 1985.

PLACINTA, C. M, D'MELLO, J. P. F et MACDONALD, A. M. C, 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 31 mars 1999. Vol. 78, n° 1, pp. 21-37. DOI 10.1016/S0377-8401(98)00278-8.

PLOETZ, Randy C., 2006. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*®. 1 juin 2006. Vol. 96, n° 6, pp. 653-656. DOI 10.1094/PHYTO-96-0653.

- PLOETZ, Randy C., 2015. Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*®. décembre 2015. Vol. 105, n° 12, pp. 1512-1521. DOI 10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW.
- PODILE, Appa Rao et KISHORE, G. Krishna, 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. In : GNANAMANICKAM, Samuel S. (éd.), *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht : Springer Netherlands. pp. 195-230. ISBN 978-1-4020-4538-7.
- POPP, József, PETŐ, Károly et NAGY, János, 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 1 janvier 2013. Vol. 33, n° 1, pp. 243-255. DOI 10.1007/s13593-012-0105-x.
- PORRAS-ALFARO, Andrea et BAYMAN, Paul, 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*. 2011. Vol. 49, pp. 291-315. DOI 10.1146/annurev-phyto-080508-081831.
- PRADHAN, Maitree, PANDEY, Priyanka, BALDWIN, Ian T. et PANDEY, Shree P., 2020. Argonaute4 Modulates Resistance to *Fusarium brachygibbosum* Infection by Regulating Jasmonic Acid Signaling. *Plant Physiology*. 1 octobre 2020. Vol. 184, n° 2, pp. 1128-1152. DOI 10.1104/pp.20.00171.
- PRAPAGDEE, Benjaphorn, KUEKULVONG, Chutima et MONGKOLSUK, Skorn, 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*. 19 septembre 2008. Vol. 4, n° 5, pp. 330-337. DOI 10.7150/ijbs.4.330.
- PRIYA, Anchal, MANDAL, Ajoy K., BALL, Andrew S., MANEFIELD, Mike, LAL, Banwari et SARMA, Priyangshu M., 2015. Mass culture strategy for bacterial yeast co-culture for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 15 novembre 2015. Vol. 100, n° 1, pp. 191-199. DOI 10.1016/j.marpolbul.2015.08.050.
- PROBST, C., BANDYOPADHYAY, R., PRICE, L. E. et COTTY, P. J., 2011. Identification of Atoxigenic *Aspergillus flavus* Isolates to Reduce Aflatoxin Contamination of Maize in Kenya. *Plant Disease*. février 2011. Vol. 95, n° 2, pp. 212-218. DOI 10.1094/PDIS-06-10-0438.
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. et MCCORMICK, S. P., 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*. août 1995. Vol. 8, n° 4, pp. 593-601. DOI 10.1094/mpmi-8-0593.
- QI, Dengfeng, ZOU, Liangping, ZHOU, Dengbo, ZHANG, Miaoyi, WEI, Yongzan, LI, Kai, ZHAO, Yankun, ZHANG, Lu et XIE, Jianghui, 2022. Biocontrol potential and antifungal mechanism of a novel *Streptomyces sichuanensis* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in vitro and in vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 février 2022. Vol. 106, n° 4, pp. 1633-1649. DOI 10.1007/s00253-022-11788-3.
- RAAIJMAKERS, Jos M., DE BRUIJN, Irene, NYBROE, Ole et ONGENA, Marc, 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. 1 novembre 2010. Vol. 34, n° 6, pp. 1037-1062. DOI 10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.

- RAGAB, M. M. M., ASHOUR, A. M. A., ABDEL-KADER, M. M., EL-MOHAMADY, R. et ABDEL-AZIZ, A., 2012. In vitro evaluation of some fungicides alternatives against *Fusarium oxysporum* the causal of wilt disease of pepper (*Capsicum annum* L.). *International Journal of Agriculture and Forestry*. 2012. Vol. 2, n° 2, pp. 70-77.
- RAO, Anjana, ZHANG, Yongqiang, MUEND, Sabina et RAO, Rajini, 2010. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. décembre 2010. Vol. 54, n° 12, pp. 5062-5069. DOI 10.1128/AAC.01050-10.
- RATEB, Mostafa, HALLYBURTON, Irene, HOUSSEN, Wael, BULL, Alan, GOODFELLOW, Michael, SANTHANAM, Rakesh, JASPARS, Marcel et EBEL, Rainer, 2013. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances*. 2013. Vol. 3, n° 34, pp. 14444-14450. DOI 10.1039/C3RA42378F.
- RAULO, Roxane, HEUSON, Egon, FROIDEVAUX, Renato et PHALIP, Vincent, 2021. Combining analytical approaches for better lignocellulosic biomass degradation: a way of improving fungal enzymatic cocktails? *Biotechnology Letters*. 1 décembre 2021. Vol. 43, n° 12, pp. 2283-2298. DOI 10.1007/s10529-021-03201-2.
- RECOUS, Sylvie, MARY, B. et FAURIE, Genevieve, 1990. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1 janvier 1990. Vol. 22, n° 7, pp. 913-922. DOI 10.1016/0038-0717(90)90129-N.
- REDDY, K. R. N., REDDY, C. S. et MURALIDHARAN, K., 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*. 1 février 2009. Vol. 20, n° 2, pp. 173-178. DOI 10.1016/j.foodcont.2008.03.009.
- REECE, Emma, DOYLE, Sean, GREALLY, Peter, RENWICK, Julie et MCCLEAN, Siobhán, 2018. *Aspergillus fumigatus* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* in Co-culture: Implications of a Mutually Antagonistic Relationship on Virulence and Inflammation in the CF Airway. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9, pp. 1205. DOI 10.3389/fmicb.2018.01205.
- REINO, José Luis, GUERRERO, Raul F., HERNÁNDEZ-GALÁN, Rosario et COLLADO, Isidro G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*. 1 janvier 2008. Vol. 7, n° 1, pp. 89-123. DOI 10.1007/s11101-006-9032-2.
- RIFAI, M. A., 1969. *A revision of the genus Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute.
- RODRÍGUEZ, Miguel, TORRES, Marta, BLANCO, Lydia, BÉJAR, Victoria, SAMPEDRO, Inmaculada et LLAMAS, Inmaculada, 2020. Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*. 5 mars 2020. Vol. 10, n° 1, pp. 4121. DOI 10.1038/s41598-020-61084-1.
- ROMANENS, Edwina, FREIMÜLLER LEISCHTFELD, Susette, VOLLAND, Andrea, STEVENS, Marc J. A., KRÄHENMANN, Ursina, ISELE, Désirée, FISCHER, Birgit, MEILE, Leo et MIESCHER SCHWENNINGER, Susanne, 2019. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2 février 2019. Vol. 290, pp. 262-272. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001.

RUPP, Sabrina, WEBER, Roland W. S., RIEGER, Daniel, DETZEL, Peter et HAHN, Matthias, 2017. Spread of *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 7.

SABRA, Wael, DIETZ, David, TIAHJASARI, Donna et ZENG, An-Ping, 2010. Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Engineering in Life Sciences*. 2010. Vol. 10, n° 5, pp. 407-421. DOI 10.1002/elsc.201000111.

SAMSON, R. A., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., HONG, S. -B., HUBKA, V., KLAASSEN, C. H. W., PERRONE, G., SEIFERT, K. A., SUSCA, A., TANNEY, J. B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T. et FRISVAD, J. C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 1 juin 2014. Vol. 78, pp. 141-173. DOI 10.1016/j.simyco.2014.07.004.

SAMSON, R.A., VARGA, J., WITIAK, S.M. et GEISER, D.M., 2007. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology*. 2007. Vol. 59, pp. 71-73. DOI 10.3114/sim.2007.59.09.

SANTAMARÍA, Johanna et BAYMAN, Paul, 2005. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*. 1 juillet 2005. Vol. 50, n° 1, pp. 1-8. DOI 10.1007/s00248-004-0002-1.

SANTOYO, Gustavo, OROZCO-MOSQUEDA, Ma. del Carmen et GOVINDAPPA, M., 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*. 1 août 2012. Vol. 22, n° 8, pp. 855-872. DOI 10.1080/09583157.2012.694413.

SANZ, Luis, MONTERO, Manuel, REDONDO, José, LLOBELL, Antonio et MONTE, Enrique, 2005. Expression of an alpha-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *The FEBS journal*. janvier 2005. Vol. 272, n° 2, pp. 493-499. DOI 10.1111/j.1742-4658.2004.04491.x.

SAPPER, Mayra, WILCASO, Paola, SANTAMARINA, M. Pilar, ROSELLÓ, Josefa et CHIRALT, Amparo, 2018. Antifungal and functional properties of starch-gellan films containing thyme (*Thymus zygis*) essential oil. *Food Control*. 1 octobre 2018. Vol. 92, pp. 505-515. DOI 10.1016/j.foodcont.2018.05.004.

SARAF, Meenu, PANDYA, Urja et THAKKAR, Aarti, 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*. 20 janvier 2014. Vol. 169, n° 1, pp. 18-29. DOI 10.1016/j.micres.2013.08.009.

SASIREKHA, Bakthavatchalu et SRIVIDYA, Shivakumar, 2016. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*. 1 juillet 2016. Vol. 50, n° 4, pp. 250-256. DOI 10.1016/j.anres.2016.02.003.

SATO, Nobuyoshi, HORIUCHI, Tatsuo, HAMANO, Mitsutoshi, SEKINE, Hiroshi, CHIBA, Satoru, YAMAMOTO, Hiroki, YOSHIOKA, Takeya, KIMURA, Ikuo, SATAKE, Mikio et IDA, Yoshiteru, 1996. Kojistatin A, a New Cysteine Protease Inhibitor Produced by *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1 janvier 1996. Vol. 60, n° 10, pp. 1747-1748. DOI 10.1271/bbb.60.1747.

SAVAZZINI, Federica, LONGA, Claudia Maria Oliveira et PERTOT, Ilaria, 2009. Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil Biology and Biochemistry*. 1 juillet 2009. Vol. 41, n° 7, pp. 1457-1465. DOI 10.1016/j.soilbio.2009.03.027.

SAVI, Daiani C., SHAABAN, Khaled A., VARGAS, Nathalia, PONOMAREVA, Larissa V., POSSIEDE, Yvelise M., THORSON, Jon S., GLIENKE, Chirlei et ROHR, Jürgen, 2015. Microbispora sp. LGMB259 endophytic actinomycete isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) producing β -carboline and indoles with biological activity. *Current Microbiology*. mars 2015. Vol. 70, n° 3, pp. 345-354. DOI 10.1007/s00284-014-0724-3.

SCARSELLETTI, R. et 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*. *Mycological Research*. 1 octobre 1994. Vol. 98, n° 10, pp. 1207-1209. DOI 10.1016/S0953-7562(09)80206-2.

SCHERLACH, Kirstin et HERTWECK, Christian, 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2009. Vol. 7, n° 9, pp. 1753-1760. DOI 10.1039/B821578B.

SCHISLER, David A., KHAN, Naseem I. et BOEHM, Michael J., 2002. Biological control of Fusarium head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2002. Vol. 504, pp. 53-69. DOI 10.1007/978-1-4615-0629-4_6.

SCHMIEDER, Robert et EDWARDS, Robert, 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 15 mars 2011. Vol. 27, n° 6, pp. 863-864. DOI 10.1093/bioinformatics/btr026.

SCHNÜRER, Johan et MAGNUSSON, Jesper, 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*. 1 janvier 2005. Vol. 16, n° 1, pp. 70-78. DOI 10.1016/j.tifs.2004.02.014.

SCHOLZ, Romy, VATER, Joachim, BUDIHARJO, Anto, WANG, Zhiyuan, HE, Yueqiu, DIETEL, Kristin, SCHWECKE, Torsten, HERFORT, Stefanie, LASCH, Peter et BORRIS, Rainer, 2014. Amylocyclicin, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*. 15 mai 2014. Vol. 196, n° 10, pp. 1842-1852. DOI 10.1128/JB.01474-14.

SCHREY, Silvia D. et TARKKA, Mika T., 2008. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1 juin 2008. Vol. 94, n° 1, pp. 11-19. DOI 10.1007/s10482-008-9241-3.

SCHROECKH, Volker, SCHERLACH, Kirstin, NÜTZMANN, Hans-Wilhelm, SHELEST, Ekaterina, SCHMIDT-HECK, Wolfgang, SCHUEMANN, Julia, MARTIN, Karin, HERTWECK, Christian et BRAKHAGE, Axel A., 2009. Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 25 août 2009. Vol. 106, n° 34, pp. 14558-14563. DOI 10.1073/pnas.0901870106.

SCHUBERT, Konstanze, 2005. Morphotaxonomic revision of foliicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). 2005. DOI 10.25673/3679.

- SCHWARZ, Jenny, HUBMANN, Georg, ROSENTHAL, Katrin et LÜTZ, Stephan, 2021. Triaging of Culture Conditions for Enhanced Secondary Metabolite Diversity from Different Bacteria. *Biomolecules*. février 2021. Vol. 11, n° 2, pp. 193. DOI 10.3390/biom11020193.
- S. DANIEL, Juliana F. de et FILHO, Edson Rodrigues, 2007. Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Product Reports*. 2007. Vol. 24, n° 5, pp. 1128-1141. DOI 10.1039/B618086H.
- SEIP, Britta, GALINSKI, Erwin A. et KURZ, Matthias, 2011. Natural and Engineered Hydroxyectoine Production Based on the *Pseudomonas stutzeri* ectABCD-ask Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 février 2011. Vol. 77, n° 4, pp. 1368-1374. DOI 10.1128/AEM.02124-10.
- SHAH, L., ALI, A., YAHYA, M., ZHU, Y., WANG, S., SI, H., RAHMAN, H. et MA, C., 2018. Integrated control of fusarium head blight and deoxynivalenol mycotoxin in wheat. *Plant Pathology*. 2018. Vol. 67, n° 3, pp. 532-548. DOI 10.1111/ppa.12785.
- SHANG, Ao, CAO, Shi-Yu, XU, Xiao-Yu, GAN, Ren-You, TANG, Guo-Yi, CORKE, Harold, MAVUMENGWANA, Vuyo et LI, Hua-Bin, 2019. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*. juillet 2019. Vol. 8, n° 7, pp. 246. DOI 10.3390/foods8070246.
- SHARIFFAH-MUZAIMAH, S. A., IDRIS, A. S., MADIHAH, A. Z., DZOLKHIFLI, O., KAMARUZZAMAN, S. et CHEONG, P. C. H., 2015. Isolation of actinomycetes from rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) for antagonism against *Ganoderma boninense*. *Journal of Oil Palm Research*. 2015. Vol. 27, n° 1, pp. 19-29.
- SHARMA, Vivek, SALWAN, Richa, SHARMA, Prem. N et KANWAR, S. S., 2017. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 février 2017. Vol. 95, pp. 72-79. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.042.
- SHEKHAR, Nilanshu, BHATTACHARYA, Debaditya, KUMAR, Dishant et GUPTA, Rajinder K., 2006. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Canadian Journal of Microbiology*. septembre 2006. Vol. 52, n° 9, pp. 805-808. DOI 10.1139/w06-035.
- SHI, Mei, CHEN, Lei, WANG, Xiao-Wei, ZHANG, Tian, ZHAO, Pei-Bao, SONG, Xiao-Yan, SUN, Cai-Yun, CHEN, Xiu-Lan, ZHOU, Bai-Cheng et ZHANG, Yu-Zhong YR 2012, 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology*. 2012. Vol. 158, n° 1, pp. 166-175. DOI 10.1099/mic.0.052670-0.
- SHIM, Hojae, SHIN, EungBai et YANG, Shang-Tian, 2002. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Advances in Environmental Research*. 1 novembre 2002. Vol. 7, n° 1, pp. 203-216. DOI 10.1016/S1093-0191(01)00132-0.
- SHINOHARA, Yasutomo, NISHIMURA, Ikuko et KOYAMA, Yasuji, 2019. Identification of a gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic, heptelidic acid, in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 3 août 2019. Vol. 83, n° 8, pp. 1506-1513. DOI 10.1080/09168451.2018.1549934.

- SHOU, Wenying, RAM, Sri et VILAR, Jose M. G., 2007. Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 6 février 2007. Vol. 104, n° 6, pp. 1877-1882. DOI 10.1073/pnas.0610575104.
- SHTARK, O. Iu, SHAPOSHNIKOV, A. I. et KRAVCHENKO, L. V., 2003. The production of antifungal metabolites by *Pseudomonas chlororaphis* grown on different nutrient sources. *Mikrobiologiya*. octobre 2003. Vol. 72, n° 5, pp. 645-650.
- SHUMILINA, D., KRÄMER, R., KLOCKE, E. et DZHAVAKHIYA, V., 2006. MF3 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of FKBP type from *Pseudomonas fluorescens*) - an elicitor of non-specific plant resistance against pathogens. *Phytopathologia Polonica*. 2006. N° No.41, pp. 39-49.
- SIEBER, Simon, DAEPPEN, Christophe, JENUL, Christian, MANNANCHERRIL, Vidya, EBERL, Leo et GADEMANN, Karl, 2020. Biosynthesis and Structure–Activity Relationship Investigations of the Diazoniumdiolate Antifungal Agent Fragin. *ChemBioChem*. 2020. Vol. 21, n° 11, pp. 1587-1592. DOI 10.1002/cbic.201900755.
- SIEUWERTS, Sander, DE BOK, Frank A. M., HUGENHOLTZ, Jeroen et VAN HYLCKAMA VLIEG, Johan E. T., 2008. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 août 2008. Vol. 74, n° 16, pp. 4997-5007. DOI 10.1128/AEM.00113-08.
- SILVA-VALDERRAMA, Isidora, TOAPANTA, Diana, MICCONO, Maria de los Angeles, LOLAS, Mauricio, DÍAZ, Gonzalo A., CANTU, Dario et CASTRO, Alvaro, 2021. Biocontrol Potential of Grapevine Endophytic and Rhizospheric Fungi Against Trunk Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 11.
- SINGH, Anil Kumar, RAUTELA, Ria et CAMEOTRA, Swaranjit Singh, 2014. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microbial Cell Factories*. décembre 2014. Vol. 13, n° 1, pp. 1-11. DOI 10.1186/1475-2859-13-67.
- SINGH, Simranjeet, SINGH, Nasib, KUMAR, Vijay, DATTA, Shivika, WANI, Abdul Basit, SINGH, Damnita, SINGH, Karan et SINGH, Joginder, 2016. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*. 1 septembre 2016. Vol. 14, n° 3, pp. 317-329. DOI 10.1007/s10311-016-0566-2.
- SIVALINGAM, Periyasamy, HONG, Kui, POTE, John et PRABAKAR, Kandasamy, 2019. Extreme Environment *Streptomyces* : Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? *International Journal of Microbiology*. 1 juillet 2019. Vol. 2019, pp. 1-20. DOI 10.1155/2019/5283948.
- SMALLING, Kelly L., KUIVILA, Kathryn M., ORLANDO, James L., PHILLIPS, Bryn M., ANDERSON, Brian S., SIEGLER, Katie, HUNT, John W. et HAMILTON, Mary, 2013. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 15 août 2013. Vol. 73, n° 1, pp. 144-153. DOI 10.1016/j.marpolbul.2013.05.028.
- SMITH, Karen, RAJENDRAN, Ranjith, KERR, Stephen, LAPPIN, David F., MACKAY, William G., WILLIAMS, Craig et RAMAGE, Gordon, 2015. *Aspergillus fumigatus* enhances elastase production in *Pseudomonas aeruginosa* co-cultures. *Medical Mycology*. 1 septembre 2015. Vol. 53, n° 7, pp. 645-655. DOI 10.1093/mmy/myv048.

- SONG, Chunxu, AUNDY, Kumar, VAN DE MORTEL, Judith et RAAIJMAKERS, Jos M., 2014. Discovery of new regulatory genes of lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters*. 1 juillet 2014. Vol. 356, n° 2, pp. 166-175. DOI 10.1111/1574-6968.12404.
- SORENSEN, K. N., KIM, K. H. et TAKEMOTO, J. Y., 1996. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. décembre 1996. Vol. 40, n° 12, pp. 2710-2713. DOI 10.1128/AAC.40.12.2710.
- SPERANDIO, Guilherme Bento et FILHO, Edivaldo Ximenes Ferreira, 2021. An overview of *Trichoderma reesei* co-cultures for the production of lignocellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 avril 2021. Vol. 105, n° 8, pp. 3019-3025. DOI 10.1007/s00253-021-11261-7.
- SRIVASTAVA, Dhruv Aditya, HARRIS, Raviv, BREUER, Gilli et LEVY, Maggie, 2021. Secretion-Based Modes of Action of Biocontrol Agents with a Focus on *Pseudozyma aphidis*. *Plants*. février 2021. Vol. 10, n° 2, pp. 210. DOI 10.3390/plants10020210.
- SRIVASTAVA, Neha, SRIVASTAVA, Manish, GUPTA, Vijai K., RAMTEKE, P. W. et MISHRA, P. K., 2018. A novel strategy to enhance biohydrogen production using graphene oxide treated thermostable crude cellulase and sugarcane bagasse hydrolyzate under co-culture system. *Bioresource Technology*. 1 décembre 2018. Vol. 270, pp. 337-345. DOI 10.1016/j.biortech.2018.09.038.
- STASIUK, Maria et KOZUBEK, A., 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1 mars 2010. Vol. 67, n° 6, pp. 841-860. DOI 10.1007/s00018-009-0193-1.
- STEIN, Torsten, 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 2005. Vol. 56, n° 4, pp. 845-857. DOI 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- STENSVAND, Arne et CHRISTIANSEN, Agnethe, 2000. Investigation on Fungicide Residues in Greenhouse-Grown Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 mars 2000. Vol. 48, n° 3, pp. 917-920. DOI 10.1021/jf990418k.
- STRÖM, Katrin, SJÖGREN, Jörgen, BROBERG, Anders et SCHNÜRER, Johan, 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. septembre 2002. Vol. 68, n° 9, pp. 4322-4327. DOI 10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002.
- SUÁREZ-QUIROZ, M. L., ALONSO CAMPOS, A., VALERIO ALFARO, G., GONZÁLEZ-RÍOS, O., VILLENEUVE, P. et FIGUEROA-ESPINOZA, M. C., 2013. Anti-*Aspergillus* activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. *Microbial Pathogenesis*. 1 août 2013. Vol. 61-62, pp. 51-56. DOI 10.1016/j.micpath.2013.05.005.
- SUGAWARA, Kanako, IGETA, Etsuno, AMANO, Yoshimi, HYUGA, Mayuko et SUGANO, Yasushi, 2019. Degradation of antifungal anthraquinone compounds is a probable physiological role of DyP secreted by *Bjerkandera adusta*. *AMB Express*. 23 avril 2019. Vol. 9, n° 1, pp. 56. DOI 10.1186/s13568-019-0779-4.

SUMMERELL, Brett A., LAURENCE, Matthew H., LIEW, Edward C. Y. et LESLIE, John F., 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity*. 1 octobre 2010. Vol. 44, n° 1, pp. 3-13. DOI 10.1007/s13225-010-0060-2.

SZEKERES, A., LEITGEB, B., KREDICS, L., ANTAL, Zsuzsanna, HATVANI, L., MANCZINGER, L. et VÁGVÖLGYI, Cs, 2005. Peptaibols and Related Peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 19 juillet 2005. Vol. 52, n° 2, pp. 137-168. DOI 10.1556/amicr.52.2005.2.2.

TAECHOWISAN, Thongchai, PEBERDY, John et LUMYONG, Saisamorn, 2003a. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6 janvier 2003. Vol. 19, pp. 381-385. DOI 10.1023/A:1023901107182.

TAECHOWISAN, Thongchai, PEBERDY, John et LUMYONG, Saisamorn, 2003b. Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Ann. Microbiol.* 1 janvier 2003. Vol. 53.

TAGUCHI, Fumiko, SUZUKI, Tomoko, INAGAKI, Yoshishige, TOYODA, Kazuhiro, SHIRAIISHI, Tomonori et ICHINOSE, Yuki, 2010. The Siderophore Pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. *Journal of Bacteriology*. janvier 2010. Vol. 192, n° 1, pp. 117-126. DOI 10.1128/JB.00689-09.

TAMURA, Saburo, MURAYAMA, Akira et HATA, Kosei, 1967. Isolation and Structural Elucidation of Fragin, a New Plant Growth Inhibitor Produced by a *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1967. Vol. 31, n° 6, pp. 758-759. DOI 10.1271/bbb1961.31.758.

TANAKA, Yukinori, HOSAKA, Takeshi et OCHI, Kozo, 2010. Rare earth elements activate the secondary metabolite–biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Antibiotics*. août 2010. Vol. 63, n° 8, pp. 477-481. DOI 10.1038/ja.2010.53.

TANIGUCHI, Masayuki et TANAKA, Takaaki, 2004. Clarification of interactions among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2004. Vol. 90, pp. 35-62. DOI 10.1007/b94191.

TANVIR, Rabia, SAJID, Imran, HASNAIN, Shahida, KULIK, Andreas et GROND, Stephanie, 2016. Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydivorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation. *Microbiological Research*. 1 avril 2016. Vol. 185, pp. 22-35. DOI 10.1016/j.micres.2016.01.003.

TAO, Kaiyun, LIU, Xiaoyan, CHEN, Xueping, HU, Xiaoxin, CAO, Liya et YUAN, Xiaoyu, 2017. Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*. 1 janvier 2017. Vol. 224, pp. 327-332. DOI 10.1016/j.biortech.2016.10.073.

TASSUS, Xavier (ed), BALESSENT, Marie-Hélène, CHILIN-CHARLES, Yolande, DE LAPEYRE DE BELLAIRE, Luc, MAKOWSKI, David, STEINBERG, Christian, SILVIE, Pierre, CASTAGNONE, Philippe, CHAUVEL, Bruno, DESNEUX, Nicolas, DESPREZ-LOUSTAU, Marie-Laure, ESCOBAR-GUTIÉRREZ, Abraham, GENTZBITTEL, Laurent, JACTEL, Hervé, LE BOURGEOIS, Thomas, NESME, Xavier, STEYER, Stéphan, SUFFERT,

Frédéric, VERDIN, Eric, VERHEGGEN, François et WETZEL, Thierry, 2018. *Risque phytosanitaire portant sur Fusarium oxysporum f. sp. cubense pour les départements d'outre-mer*. ANSES. [Consulté le 21 novembre 2022]. ISBN 979-10-286-0249-9.

TENGGU NORSALWANI, T. L., RAHMAN, N. N. N. A. et MOFTAH MASSAUD, B. N., 2012. Cellulase activity and glucose production by *Bacillus cereus* monoculture and co-culture utilizing palm kernel cake (PKC) under solid state fermentation. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering (IPCBE)*. 2012. Vol. 33, pp. 172-177.

TERABAYASHI, Yasunobu, SANO, Motoaki, YAMANE, Noriko, MARUI, Junichiro, TAMANO, Koichi, SAGARA, Junichi, DOHMOTO, Mitsuko, ODA, Ken, OHSHIMA, Eiji, TACHIBANA, Kuniharu, HIGA, Yoshitaka, OHASHI, Shinichi, KOIKE, Hideaki et MACHIDA, Masayuki, 2010. Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*. 1 décembre 2010. Vol. 47, n° 12, pp. 953-961. DOI 10.1016/j.fgb.2010.08.014.

THOMSON, W. T., 1973. Agricultural chemicals book IV - fungicides. *Agricultural chemicals book IV - fungicides*. 1973.

TORGESON, Dewayne, 1967. *Agricultural and Industrial Applications Environmental Interactions: An Advanced Treatise*. Elsevier. ISBN 978-0-323-14302-8.

TRAIL, Frances, 2009. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. *Plant Physiology*. janvier 2009. Vol. 149, n° 1, pp. 103-110. DOI 10.1104/pp.108.129684.

TSANG, Adrian, BUTLER, Gregory, POWLOWSKI, Justin, PANISKO, Ellen A. et BAKER, Scott E., 2009. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genetics and Biology*. 1 mars 2009. Vol. 46, n° 1, Supplement, pp. S153-S160. DOI 10.1016/j.fgb.2008.07.014.

TSCHARNTKE, Teja, CLOUGH, Yann, WANGER, Thomas C., JACKSON, Louise, MOTZKE, Iris, PERFECTO, Ivette, VANDERMEER, John et WHITBREAD, Anthony, 2012. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biological Conservation*. 1 juillet 2012. Vol. 151, n° 1, pp. 53-59. DOI 10.1016/j.biocon.2012.01.068.

TSHIKANTWA, Tiroyaone Shimane, ULLAH, Muhammad Wajid, HE, Feng et YANG, Guang, 2018. Current Trends and Potential Applications of Microbial Interactions for Human Welfare. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9.

TSUJIBO, H., OKAMOTO, T., HATANO, N., MIYAMOTO, K., WATANABE, T., MITSUTOMI, M. et INAMORI, Y., 2000. Family 19 chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: molecular cloning and characterization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. novembre 2000. Vol. 64, n° 11, pp. 2445-2453. DOI 10.1271/bbb.64.2445.

TULLIO, Vivian, ROANA, Janira, SCALAS, Daniela et MANDRAS, Narcisa, 2019. Evaluation of the Antifungal Activity of *Mentha x piperita* (*Lamiaceae*) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles. *Molecules*. janvier 2019. Vol. 24, n° 17, pp. 3148. DOI 10.3390/molecules24173148.

- TURK, B., TURK, D. et SALVESEN, G.S., 2002. Regulating Cysteine Protease Activity: Essential Role of Protease Inhibitors As Guardians and Regulators. *Current Pharmaceutical Design*. 1 août 2002. Vol. 8, n° 18, pp. 1623-1637. DOI 10.2174/1381612023394124.
- UEDA, Kenji, OINUMA, Ken-Ichi, IKEDA, Go, HOSONO, Kuniaki, OHNISHI, Yasuo, HORINOUCI, Sueharu et BEPPU, Teruhiko, 2002. AmfS, an Extracellular Peptidic Morphogen in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*. mars 2002. Vol. 184, n° 5, pp. 1488-1492. DOI 10.1128/JB.184.5.1488-1492.2002.
- USALL, Josep, TORRES, Rosario et TEIXIDÓ, Neus, 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Current Opinion in Food Science*. 1 octobre 2016. Vol. 11, pp. 51-55. DOI 10.1016/j.cofs.2016.09.002.
- VALDEZ-VAZQUEZ, Idania et POGGI-VARALDO, Héctor M., 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 1 juin 2009. Vol. 13, n° 5, pp. 1000-1013. DOI 10.1016/j.rser.2008.03.003.
- VANDERMOLEN, Karen M., RAJA, Huzefa A., EL-ELIMAT, Tamam et OBERLIES, Nicholas H., 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*. 17 décembre 2013. Vol. 3, n° 1, pp. 71. DOI 10.1186/2191-0855-3-71.
- VAN DONGEN, Pieter W. J. et DE GROOT, Akosua N. J. A., 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1 juin 1995. Vol. 60, n° 2, pp. 109-116. DOI 10.1016/0028-2243(95)02104-Z.
- VÁZQUEZ, Gema, MELGAREJO, Paloma, DE CAL, Antonieta et LARENA, Inmaculada, 2013. Persistence, survival, vertical dispersion, and horizontal spread of the biocontrol agent, *Penicillium oxalicum* strain 212, in different soil types. *Applied Soil Ecology*. 1 mai 2013. Vol. 67, pp. 27-36. DOI 10.1016/j.apsoil.2013.02.005.
- VENKATARAMAN, Arvind, ROSENBAUM, Miriam A., PERKINS, Sarah D., WERNER, Jeffrey J. et ANGENENT, Largus T., 2011. Metabolite-based mutualism between *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and *Enterobacter aerogenes* enhances current generation in bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*. 25 octobre 2011. Vol. 4, n° 11, pp. 4550-4559. DOI 10.1039/C1EE01377G.
- VERA, J., CASTRO, J., CONTRERAS, R. A., GONZÁLEZ, A. et MOENNE, A., 2012. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. *Xanthi*). *PMPP Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2012. Vol. 79, pp. 31-39.
- VERMA, V C, SINGH, S K et PRAKASH, Satya, 2011. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of basic microbiology*. 1 octobre 2011. Vol. 51, n° 5, pp. 550-556. DOI 10.1002/jobm.201000155.
- VIAENE, Tom, LANGENDRIES, Sarah, BEIRINCKX, Stien, MAES, Martine et GOORMACHTIG, Sofie, 2016. *Streptomyces* as a plant's best friend? *FEMS Microbiology Ecology*. 1 août 2016. Vol. 92, n° 8, pp. fiw119. DOI 10.1093/femsec/fiw119.

VINALE, F., NICOLETTI, R., BORRELLI, F., MANGONI, A., PARISI, O. A., MARRA, R., LOMBARDI, N., LACATENA, F., GRAUSO, L., FINIZIO, S., LORITO, M. et WOO, S. L., 2017. Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. *Scientific Reports*. 30 octobre 2017. Vol. 7, n° 1, pp. 14330. DOI 10.1038/s41598-017-14569-5.

VINALE, Francesco, FLEMATTI, Gavin, SIVASITHAMPARAM, Krishnapillai, LORITO, Matteo, MARRA, Roberta, SKELTON, Brian W. et GHISALBERTI, Emilio L., 2009. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*. 30 novembre 2009. Vol. 72, n° 11, pp. 2032-2035. DOI 10.1021/np900548p.

VINALE, Francesco, NIGRO, Marco, SIVASITHAMPARAM, Krishnapillai, FLEMATTI, Gavin, GHISALBERTI, Emilio L., RUOCCO, Michelina, VARLESE, Rosaria, MARRA, Roberta, LANZUISE, Stefania, EID, Ahmed, WOO, Sheridan L. et LORITO, Matteo, 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 1 octobre 2013. Vol. 347, n° 2, pp. 123-129. DOI 10.1111/1574-6968.12231.

VINALE, Francesco, SIVASITHAMPARAM, Krishnapillai, GHISALBERTI, Emilio L., WOO, Sheridan L., NIGRO, Marco, MARRA, Roberta, LOMBARDI, Nadia, PASCALE, Alberto, RUOCCO, Michelina, LANZUISE, Stefania, MANGANIELLO, Gelsomina et LORITO, Matteo, 2014. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal*. juillet 2014. Vol. 8, n° 1.

VISCA, Paolo, IMPERI, Francesco et LAMONT, Iain L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*. 1 janvier 2007. Vol. 15, n° 1, pp. 22-30. DOI 10.1016/j.tim.2006.11.004.

VISWANATHAN, R. et SAMIYAPPAN, R., 2001. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. *Microbiological Research*. 1 mars 2001. Vol. 155, n° 4, pp. 309-314. DOI 10.1016/S0944-5013(01)80009-4.

VITERBO, Ada, HARAN, Shoshan, FRIESEM, Dana, RAMOT, Ofir et CHET, Ilan, 2001. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*. 1 juin 2001. Vol. 200, n° 2, pp. 169-174. DOI 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10710.x.

VIZCAINO, Juan A., SANZ, Luis, BASILIO, Angela, VICENTE, Francisca, GUTIERREZ, Santiago, HERMOSA, M. Rosa et MONTE, Enrique, 2005. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*. 1 décembre 2005. Vol. 109, n° 12, pp. 1397-1406. DOI 10.1017/S0953756205003898.

VOINOVA, Tatiana, KARTASHOV, Maksim, PASECHNIK, Tatiana, SHCHERBAKOVA, Larisa, STATSYUK, Natalia et DZHAVAKHIYA, Vitaly, 2021. Peptidyl prolyl cis/trans isomerase from *Pseudomonas fluorescens* encapsulated into biodegradable natural polymers: A potential plant protection agent inducing plant resistance to fungal pathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1 septembre 2021. Vol. 36, pp. 102112. DOI 10.1016/j.bcab.2021.102112.

- VURUKONDA, Sai Shiva Krishna Prasad, GIOVANARDI, Davide et STEFANI, Emilio, 2018. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*. avril 2018. Vol. 19, n° 4, pp. 952. DOI 10.3390/ijms19040952.
- WAKSMAN, S. A., 1943. Production and Activity of Streptothricin. *Journal of Bacteriology*. 1943. Vol. 46, n° 3, pp. 299-310.
- WALKER, Anne-Sophie, MICOUD, Annie, RÉMUSON, Florent, GROSMAN, Jacques, GREDET, Michel et LEROUX, Pierre, 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science*. juin 2013. Vol. 69, n° 6, pp. 667-678. DOI 10.1002/ps.3506.
- WANG, Bozhen, LI, Li, LIN, Yuheng, SHEN, Danyu, SHAO, Xiaolong, ZHONG, Caihong et QIAN, Guoliang, 2022. Targeted isolation of biocontrol agents from plants through phytopathogen co-culture and pathogen enrichment. *Phytopathology Research*. 26 mai 2022. Vol. 4, n° 1, pp. 19. DOI 10.1186/s42483-022-00124-2.
- WANG, Changlu, WANG, Zhifang, QIAO, Xi, LI, Zhenjing, LI, Fengjuan, CHEN, Mianhua, WANG, Yurong, HUANG, Yufang et CUI, Haiyan, 2013a. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiology Letters*. 1 avril 2013. Vol. 341, n° 1, pp. 45-51. DOI 10.1111/1574-6968.12088.
- WANG, Changlu, WANG, Zhifang, QIAO, Xi, LI, Zhenjing, LI, Fengjuan, CHEN, Mianhua, WANG, Yurong, HUANG, Yufang et CUI, Haiyan, 2013b. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS microbiology letters*. avril 2013. Vol. 341, n° 1, pp. 45-51. DOI 10.1111/1574-6968.12088.
- WANG, J., ZHANG, X., GAO, L., WANG, L., SONG, F., ZHANG, L. et WAN, Y., 2021. The synergistic antifungal activity of resveratrol with azoles against *Candida albicans*. *Letters in Applied Microbiology*. 2021. Vol. 72, n° 6, pp. 688-697. DOI 10.1111/lam.13458.
- WANG, Kairui, LIU, Ning, SHANG, Fei, HUANG, Jiao, YAN, Bingfa, LIU, Minghao et HUANG, Ying, 2021. Activation of Secondary Metabolism in Red Soil-Derived Streptomycetes via Co-Culture with Mycolic Acid-Containing Bacteria. *Microorganisms*. novembre 2021. Vol. 9, n° 11, pp. 2187. DOI 10.3390/microorganisms9112187.
- WANG, Q. -M., BEGEROW, D., GROENEWALD, M., LIU, X. -Z., THEELEN, B., BAI, F. -Y. et BOEKHOUT, T., 2015. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*. *Studies in Mycology*. 1 juin 2015. Vol. 81, pp. 55-83. DOI 10.1016/j.simyco.2015.10.004.
- WANG, Xiaoning, RADWAN, Mohamed M., TARÁWNEH, Amer H., GAO, Jiangtao, WEDGE, David E., ROSA, Luiz H., CUTLER, Horace G. et CUTLER, Stephen J., 2013. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15 mai 2013. Vol. 61, n° 19, pp. 4551-4555. DOI 10.1021/jf400212y.
- WANG, Xiaoning, WEDGE, David E et CUTLER, Stephen J, 2016. Chemical and Biological Study of Cladosporin, an Antimicrobial Inhibitor: A Review. *Natural Product Communications*. 1 octobre 2016. Vol. 11, n° 10, pp. 1934578X1601101039. DOI 10.1177/1934578X1601101039.

WANG, Xiuguo, SONG, Min, WANG, Yiqi, GAO, Chunming, ZHANG, Qun, CHU, Xiaoqiang, FANG, Hua et YU, Yunlong, 2012. Response of soil bacterial community to repeated applications of carbendazim. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 janvier 2012. Vol. 75, pp. 33-39. DOI 10.1016/j.ecoenv.2011.08.014.

WANG, Xue, ZHOU, Haibo, CHEN, Hanna, JING, Xiaoshu, ZHENG, Wentao, LI, Ruijuan, SUN, Tao, LIU, Jiaqi, FU, Jun, HUO, Liuji, LI, Yue-zhong, SHEN, Yuemao, DING, Xiaoming, MÜLLER, Rolf, BIAN, Xiaoying et ZHANG, Youming, 2018. Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in Burkholderiales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. mai 2018. Vol. 115, n° 18, pp. E4255-E4263. DOI 10.1073/pnas.1720941115.

WATVE, M. G., TICKOO, R., JOG, M. M. et BHOLE, B. D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*. novembre 2001. Vol. 176, n° 5, pp. 386-390. DOI 10.1007/s002030100345.

WEBER, Wilfried, BABA, Marie Daoud-El et FUSSENEGGER, Martin, 2007. Synthetic ecosystems based on airborne inter- and intrakingdom communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19 juin 2007. Vol. 104, n° 25, pp. 10435-10440. DOI 10.1073/pnas.0701382104.

WEI, Shaopeng, ZHANG, Wenhao et JI, Zhiqin, 2015. Structure and Antibacterial Activity of Ambobactin, a New Telomycin-Like Cyclic Depsipeptide Antibiotic Produced by *Streptomyces ambofaciens* F3. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 9 septembre 2015. Vol. 20, n° 9, pp. 16278-16289. DOI 10.3390/molecules200916278.

WEINDLING, R., 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopath.* 9 avril 1932. Vol. 22, n° 10, pp. 837-845.

WELLER, David M., 2007. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*®. février 2007. Vol. 97, n° 2, pp. 250-256. DOI 10.1094/PHYTO-97-2-0250.

WEWETZER, S. J., KUNZE, M., LADNER, T., LUCHTERHAND, B., ROTH, S., RAHMEN, N., KLOSS, R., COSTA E SILVA, A., REGESTEIN, L. et BÜCHS, J., 2015. Parallel use of shake flask and microtiter plate online measuring devices (RAMOS and BioLector) reduces the number of experiments in laboratory-scale stirred tank bioreactors. *Journal of Biological Engineering*. 30 mai 2015. Vol. 9, n° 1, pp. 9. DOI 10.1186/s13036-015-0005-0.

WHIPPS, John M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 1 mars 2001. Vol. 52, n° suppl_1, pp. 487-511. DOI 10.1093/jexbot/52.suppl_1.487.

WIN, Theint Theint, BO, Bo, MALEC, Przemyslaw, KHAN, Sikandar et FU, Pengcheng, 2021. Newly isolated strain of *Trichoderma asperellum* from disease suppressive soil is a potential bio-control agent to suppress *Fusarium* soil borne fungal phytopathogens. *Journal of Plant Pathology*. 1 mai 2021. Vol. 103, n° 2, pp. 549-561. DOI 10.1007/s42161-021-00780-x.

WINSON, M K, CAMARA, M, LATIFI, A, FOGLINO, M, CHHABRA, S R, DAYKIN, M, BALLY, M, CHAPON, V, SALMOND, G P et BYCROFT, B W, 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and

secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 septembre 1995. Vol. 92, n° 20, pp. 9427-9431. DOI 10.1073/pnas.92.20.9427.

WINSOR, Geoffrey L. et BRINKMAN, Fiona S. L., 2014. Mining the *Pseudomonas* Genome. In : FILLOUX, Alain et RAMOS, Juan-Luis (éd.), *Pseudomonas Methods and Protocols*. New York, NY : Springer. pp. 417-432. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-0473-0.

WU, Changsheng, ZACCHETTI, Boris, RAM, Arthur F. J., VAN WEZEL, Gilles P., CLAESSEN, Dennis et HAE CHOI, Young, 2015. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. *Scientific Reports*. 4 juin 2015. Vol. 5, n° 1, pp. 10868. DOI 10.1038/srep10868.

WU, Qiong, NI, Mi, DOU, Kai, TANG, Jun, REN, Jianhong, YU, Chuanjin et CHEN, Jie, 2018. Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microbial Cell Factories*. 3 octobre 2018. Vol. 17, n° 1, pp. 155. DOI 10.1186/s12934-018-1004-x.

WU, Weihui, JIN, Yongxin, BAI, Fang et JIN, Shouguang, 2015. Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. In : TANG, Yi-Wei, SUSSMAN, Max, LIU, Dongyou, POXTON, Ian et SCHWARTZMAN, Joseph (éd.), *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Boston : Academic Press. pp. 753-767. ISBN 978-0-12-397169-2.

XIAO-YAN, Song, QING-TAO, Shen, SHU-TAO, Xie, XIU-LAN, Chen, CAI-YUN, Sun et YU-ZHONG, Zhang, 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. 1 juillet 2006. Vol. 260, n° 1, pp. 119-125. DOI 10.1111/j.1574-6968.2006.00316.x.

XIN, Xiu-Fang, KVITKO, Brian et HE, Sheng Yang, 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. mai 2018. Vol. 16, n° 5, pp. 316-328. DOI 10.1038/nrmicro.2018.17.

XU, Liangxiong, FENG, Linyan, SUN, Jian, MAO, Lutian, LI, Xiaojie, JIANG, Yueming, DUAN, Xuewu et LI, Taotao, 2022. Antifungal activities of a natural trisaccharide ester against sour rot in mandarin fruit. *Postharvest biology and technology*. 2022. Vol. 191, pp. 111981-. DOI 10.1016/j.postharvbio.2022.111981.

XU, Lin, YE, Kai-Xiong, DAI, Wen-Hua, SUN, Cong, XU, Lian-Hua et HAN, Bing-Nan, 2019. Comparative Genomic Insights into Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Cluster Distributions of Marine *Streptomyces*. *Marine Drugs*. septembre 2019. Vol. 17, n° 9, pp. 498. DOI 10.3390/md17090498.

XU, Zhihui, SHAO, Jiahui, LI, Bing, YAN, Xin, SHEN, Qirong et ZHANG, Ruifu, 2013. Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Antifungal Activity and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*. février 2013. Vol. 79, n° 3, pp. 808-815. DOI 10.1128/AEM.02645-12.

YANG, Lirong, HAN, Xiaoyun, ZHANG, Fan, GOODWIN, Paul H., YANG, Yanyan, LI, Jia, XIA, Mingcong, SUN, Runhong, JIA, Bin, ZHANG, Jie, QUAN, Xin, WU, Chao, XUE, Baoguo et LU, Chuantao, 2018. Screening *Bacillus* species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* on wheat. *Biological Control*. 1 mars 2018. Vol. 118, pp. 1-9. DOI 10.1016/j.biocontrol.2017.11.004.

- YANG, Mingguan, LU, Laifeng, PANG, Jing, HU, Yiling, GUO, Qingbin, LI, Zhenjing, WU, Shufen, LIU, Huanhuan et WANG, Changlu, 2019. Biocontrol activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1 against *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Journal of Microbiology*. 1 mai 2019. Vol. 57, n° 5, pp. 396-404. DOI 10.1007/s12275-019-8517-9.
- YEN, Gow-Chin, CHANG, Yung-Chi et SU, Sheu-Wen, 2003. Antioxidant activity and active compounds of rice koji fermented with *Aspergillus candidus*. *Food Chemistry*. 1 octobre 2003. Vol. 83, n° 1, pp. 49-54. DOI 10.1016/S0308-8146(03)00035-9.
- YEN, Hong-Wei, CHEN, Pin-Wen et CHEN, Li-Juan, 2015. The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation. *Bioresource Technology*. 1 mai 2015. Vol. 184, pp. 148-152. DOI 10.1016/j.biortech.2014.09.113.
- YIN, Y., LIU, X., LI, B. et MA, Z., 2009. Characterization of Sterol Demethylation Inhibitor-Resistant Isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* Collected from Wheat in China. *Phytopathology*®. mai 2009. Vol. 99, n° 5, pp. 487-497. DOI 10.1094/PHYTO-99-5-0487.
- YOSHIDA, Kentaro, SCHUENEMANN, Verena J, CANO, Liliana M, PAIS, Marina, MISHRA, Bagdevi, SHARMA, Rahul, LANZ, Chirsta, MARTIN, Frank N, KAMOUN, Sophien, KRAUSE, Johannes, THINES, Marco, WEIGEL, Detlef et BURBANO, Hernán A, 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. BAULCOMBE, David (éd.), *eLife*. 28 mai 2013. Vol. 2, pp. e00731. DOI 10.7554/eLife.00731.
- YU, Liyan, DING, Wanjing et MA, Zhongjun, 2016. Induced production of cytochalasans in co-culture of marine fungus *Aspergillus flavipes* and actinomycete *Streptomyces* sp. *Natural Product Research*. 2 août 2016. Vol. 30, n° 15, pp. 1718-1723. DOI 10.1080/14786419.2015.1136910.
- YU, Liyan, HU, Zhifei et MA, Zhongjun, 2015. Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine *Streptomyces* with *Bacillus mycoides*. *Natural Product Research*. 17 novembre 2015. Vol. 29, n° 22, pp. 2087-2091. DOI 10.1080/14786419.2015.1005619.
- YU, Meilin, LI, Yingxin, BANAKAR, Shivakumar P., LIU, Lu, SHAO, Changlun, LI, Zhiyong et WANG, Changyun, 2019. New Metabolites From the Co-culture of Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and Fungus *Rhinocladiella similis* 35. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10.
- YU, Xianmei, AI, Chengxiang, XIN, Li et ZHOU, Guangfang, 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*. 1 mars 2011. Vol. 47, n° 2, pp. 138-145. DOI 10.1016/j.ejsobi.2010.11.001.
- YU, Xiao, LI, Bo, FU, Yanping, JIANG, Daohong, GHABRIAL, Said A., LI, Guoqing, PENG, Youliang, XIE, Jiatao, CHENG, Jiasen, HUANG, Junbin et YI, Xianhong, 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 4 mai 2010. Vol. 107, n° 18, pp. 8387-8392. DOI 10.1073/pnas.0913535107.

- YUAN, Jun, RAZA, Waseem, SHEN, Qirong et HUANG, Qiwei, 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubeense*. *Applied and Environmental Microbiology*. août 2012. Vol. 78, n° 16, pp. 5942-5944. DOI 10.1128/AEM.01357-12.
- YUAN, W. M. et CRAWFORD, D. L., 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*. août 1995. Vol. 61, n° 8, pp. 3119-3128. DOI 10.1128/aem.61.8.3119-3128.1995.
- ZARN, Jürg A., BR, üschweiler Beat J. et SCHLATTER, Josef R., 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environmental Health Perspectives*. mars 2003. Vol. 111, n° 3, pp. 255-261. DOI 10.1289/ehp.5785.
- ZEIGLER, Daniel R. et PERKINS, John B., 2009. The Genus *Bacillus*. In : *Practical Handbook of Microbiology*. 2. CRC Press. ISBN 978-1-00-309927-7.
- ZHANG, Jianguo et HU, Bo, 2012. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresource Technology*. 1 juin 2012. Vol. 114, pp. 529-535. DOI 10.1016/j.biortech.2012.03.054.
- ZHANG, Li, SHI, Yunfei, DUAN, Xinying, HE, Wanrong, SI, Hongyan, WANG, Peng, CHEN, Shangxing, LUO, Hai, RAO, Xiaoping, WANG, Zongde et LIAO, Shengliang, 2021. Novel Citral-thiazolyl Hydrazine Derivatives as Promising Antifungal Agents against Phytopathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 8 décembre 2021. Vol. 69, n° 48, pp. 14512-14519. DOI 10.1021/acs.jafc.1c04064.
- ZHANG, Yanyan, HAN, Ting, MING, Qianliang, WU, Lingshang, RAHMAN, Khalid et QIN, Luping, 2012. Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. *Natural Product Communications*. 1 juillet 2012. Vol. 7, n° 7, pp. 1934578X1200700742. DOI 10.1177/1934578X1200700742.
- ZHANG, Zhiping, JI, Hairui, GONG, Guiping, ZHANG, Xu et TAN, Tianwei, 2014. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresource Technology*. juillet 2014. Vol. 164, pp. 93-99. DOI 10.1016/j.biortech.2014.04.039.
- ZHANG, Zhuo-Xi, YANG, Xue-Qiong, ZHOU, Qing-Yan, WANG, Bang-Yan, HU, Ming, YANG, Ya-Bin, ZHOU, Hao et DING, Zhong-Tao, 2018. New Azaphilones from *Nigrospora oryzae* Co-Cultured with *Beauveria bassiana*. *Molecules*. juillet 2018. Vol. 23, n° 7, pp. 1816. DOI 10.3390/molecules23071816.
- ZHAO, Chen, DENG, Lu et FANG, Hao, 2018. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. *Biomass and Bioenergy*. 1 mai 2018. Vol. 112, pp. 93-98. DOI 10.1016/j.biombioe.2018.03.001.
- ZHAO, Xin, ZHOU, Zhi-Jiang, HAN, ye, WANG, Zhan-Zhong, FAN, Jie et XIAO, Hua-Zhi, 2013. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological research*. 29 mars 2013. Vol. 168. DOI 10.1016/j.micres.2013.03.001.

ZHAO, Zhenzhen, WANG, Qiushuo, WANG, Kaimei, BRIAN, Kemp, LIU, Changhong et GU, Yucheng, 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*. janvier 2010. Vol. 101, n° 1, pp. 292-297. DOI 10.1016/j.biortech.2009.07.071.

ZHOU, Yujie, YANG, Hong, ZHOU, Xuedong, LUO, Hongke, TANG, Fan, YANG, Jin, ALTEROVITZ, Gil, CHENG, Lei et REN, Biao, 2018. Lovastatin synergizes with itraconazole against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans* through the regulation on ergosterol biosynthesis pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. juin 2018. Vol. 102, n° 12, pp. 5255-5264. DOI 10.1007/s00253-018-8959-8.

ZHU, Z.X. et ZHUANG, W.Y., 2015. *Trichoderma (Hypocrea)* species with green ascospores from China. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. juin 2015. Vol. 34, pp. 113-129. DOI 10.3767/003158515X686732.

ZUCK, Karina M., SHIPLEY, Suzanne et NEWMAN, David J., 2011. Induced Production of N-Formyl Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by Co-culture with *Streptomyces peucetius*. *Journal of Natural Products*. 22 juillet 2011. Vol. 74, n° 7, pp. 1653-1657. DOI 10.1021/np200255f.

ZULQARNAIN, null, IQBAL, Zafar, COX, Russell, ANWAR, Jawad, AHMAD, Nasir, KHAN, Khalid, IQBAL, Mudassar, MANZOOR, Nazish et KHATTAK, Saeed Ullah, 2020. Antifungal activity of compounds isolated from *Aspergillus niger* and their molecular docking studies with tomatinase. *Natural Product Research*. septembre 2020. Vol. 34, n° 18, pp. 2642-2646. DOI 10.1080/14786419.2018.1548447.

ANNEXES

A. Informations complémentaires du chapitre 3

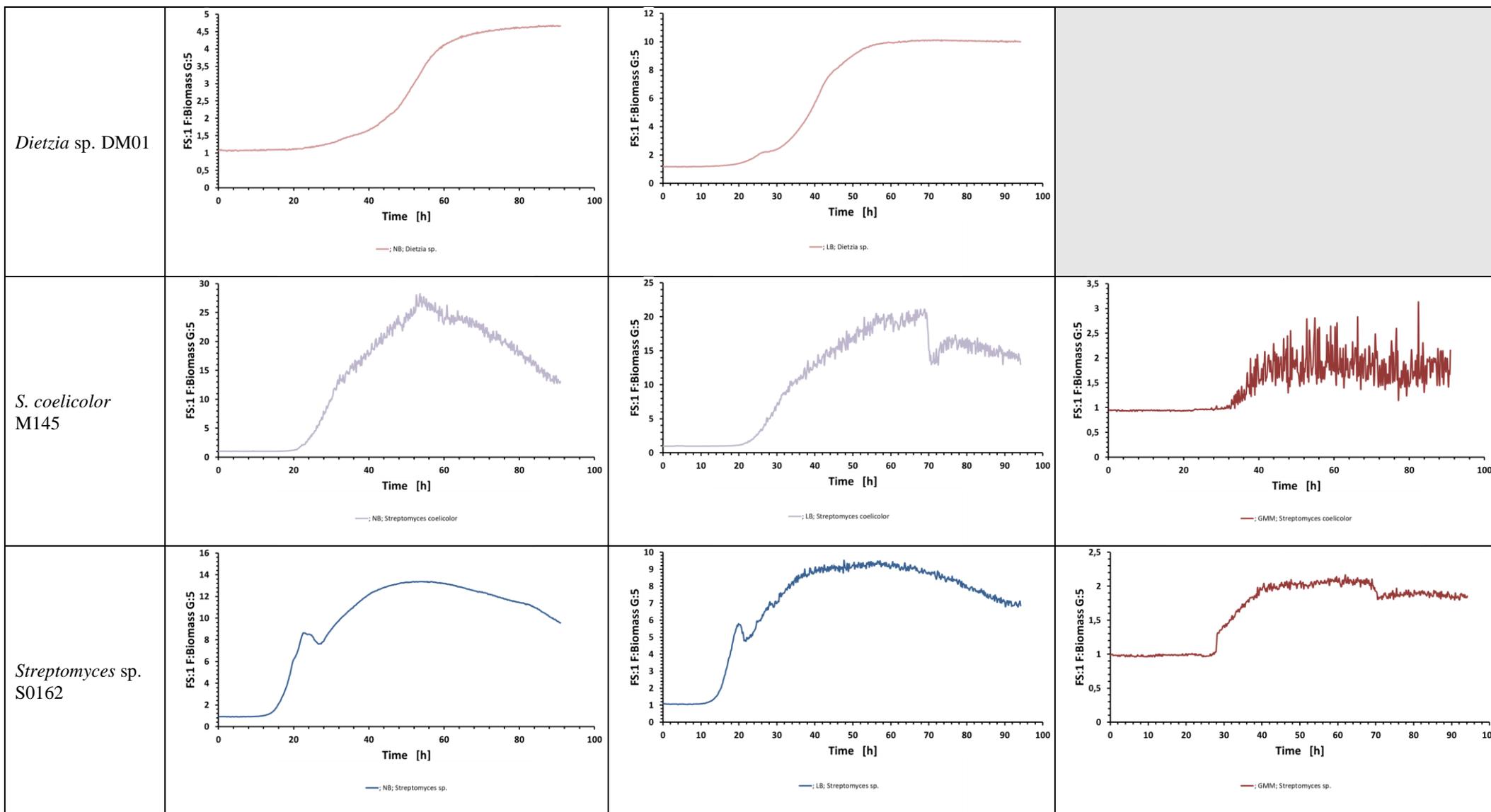
Ces annexes correspondent aux courbes de croissance des monocultures et co-cultures en BioLector (Chapitre 3 partie 3.1). Elles comprennent les conditions de milieu riche (LB et NB) ainsi que le milieu minimum (GMM) et incluent les deux répétitions réalisées.

Elles sont présentées comme dans la publication sur les travaux de criblage pour une activité antifongique : Mephane E., Imatoukene N., Heuson E., Lopez M., Phalip V. : Screening for antifungal activities produced by bacteria-fungi co-cultures through microfermentations – Soumission prévue en octobre 2022 dans *Frontiers in Microbiology*.

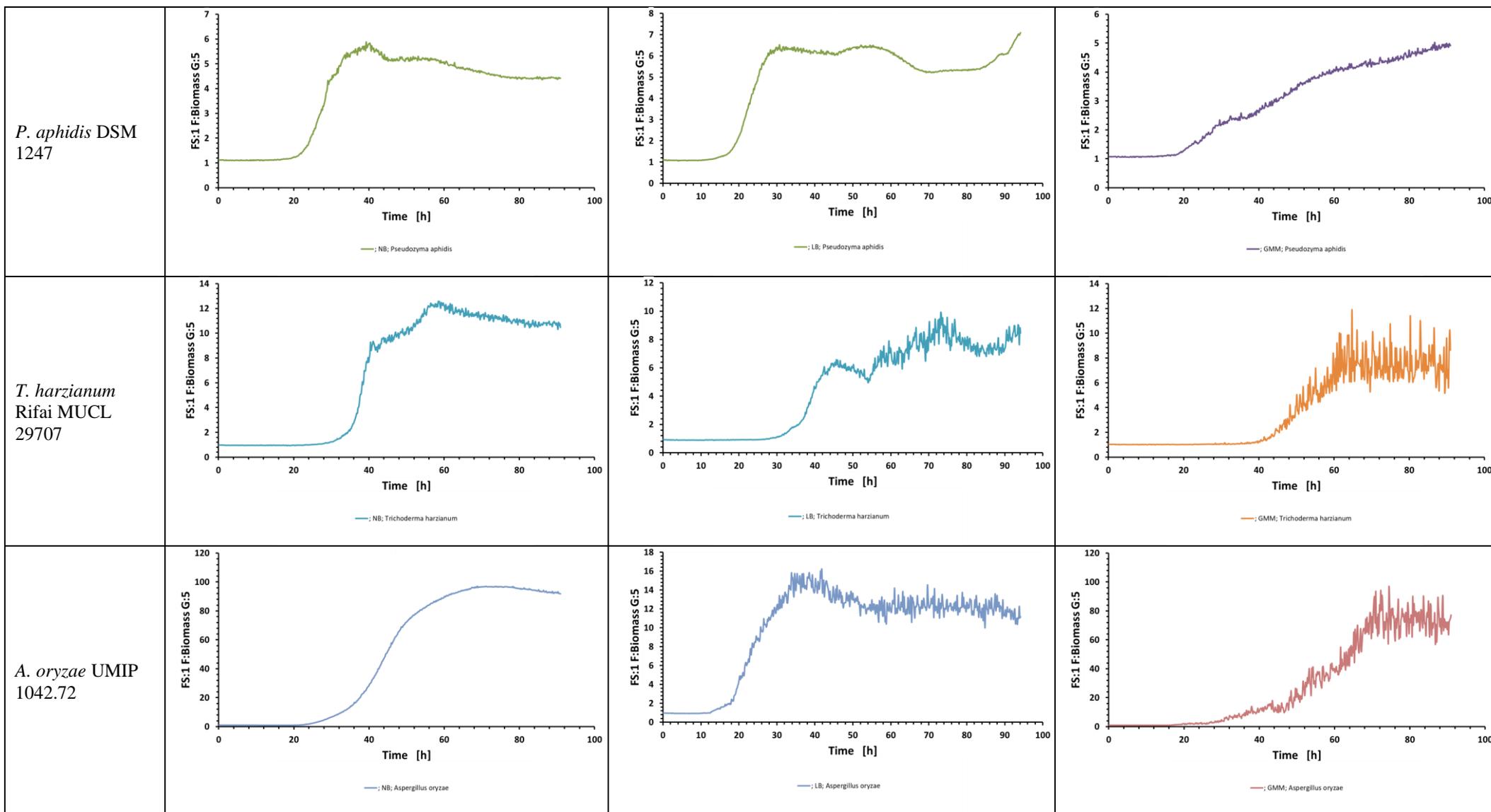
Tableau A-1 : Courbes de croissance des 10 microorganismes sélectionnés dans les trois conditions de milieu (NB, LB, GMM) dans le BioLector.

Espèce	Milieu NB	Milieu LB	Milieu GMM
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	<p>—; NB; Bacillus subtilis</p>	<p>—; LB; Bacillus subtilis</p>	
<i>P. syringae</i> DSM 10604	<p>—; NB; Pseudomonas syringae</p>	<p>—; LB; Pseudomonas syringae</p>	

Annexe A



Annexe A



Annexe A

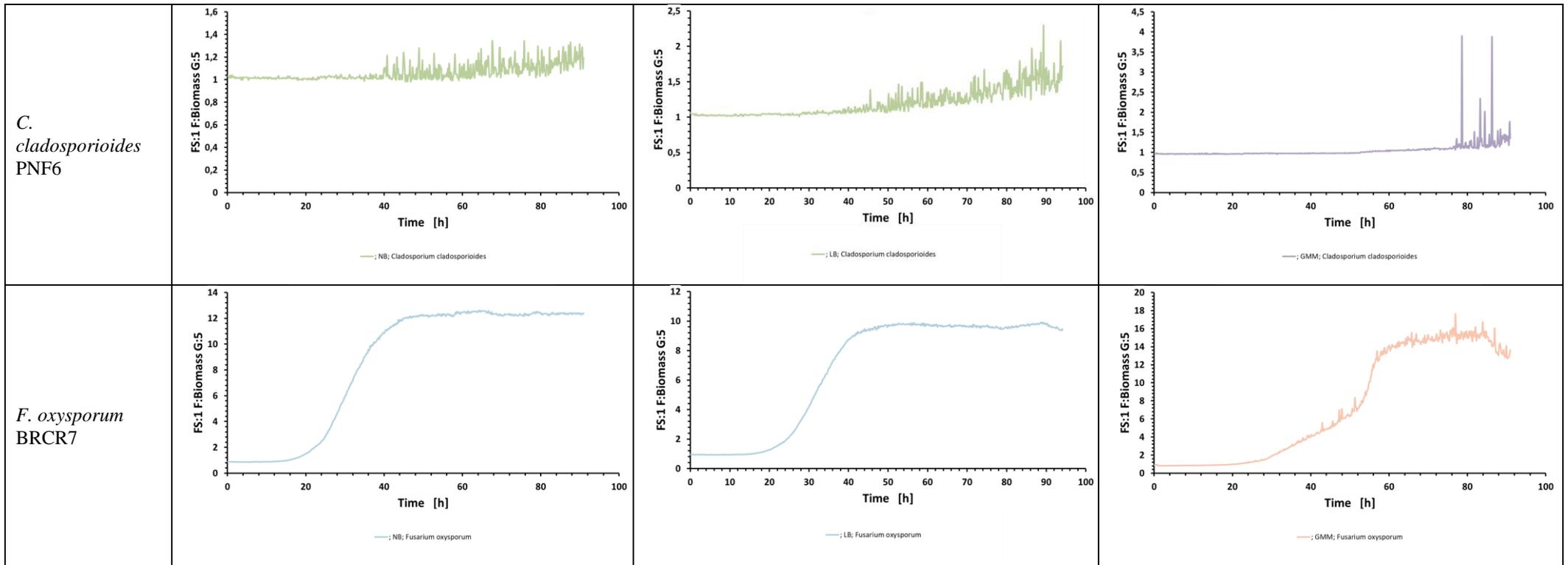
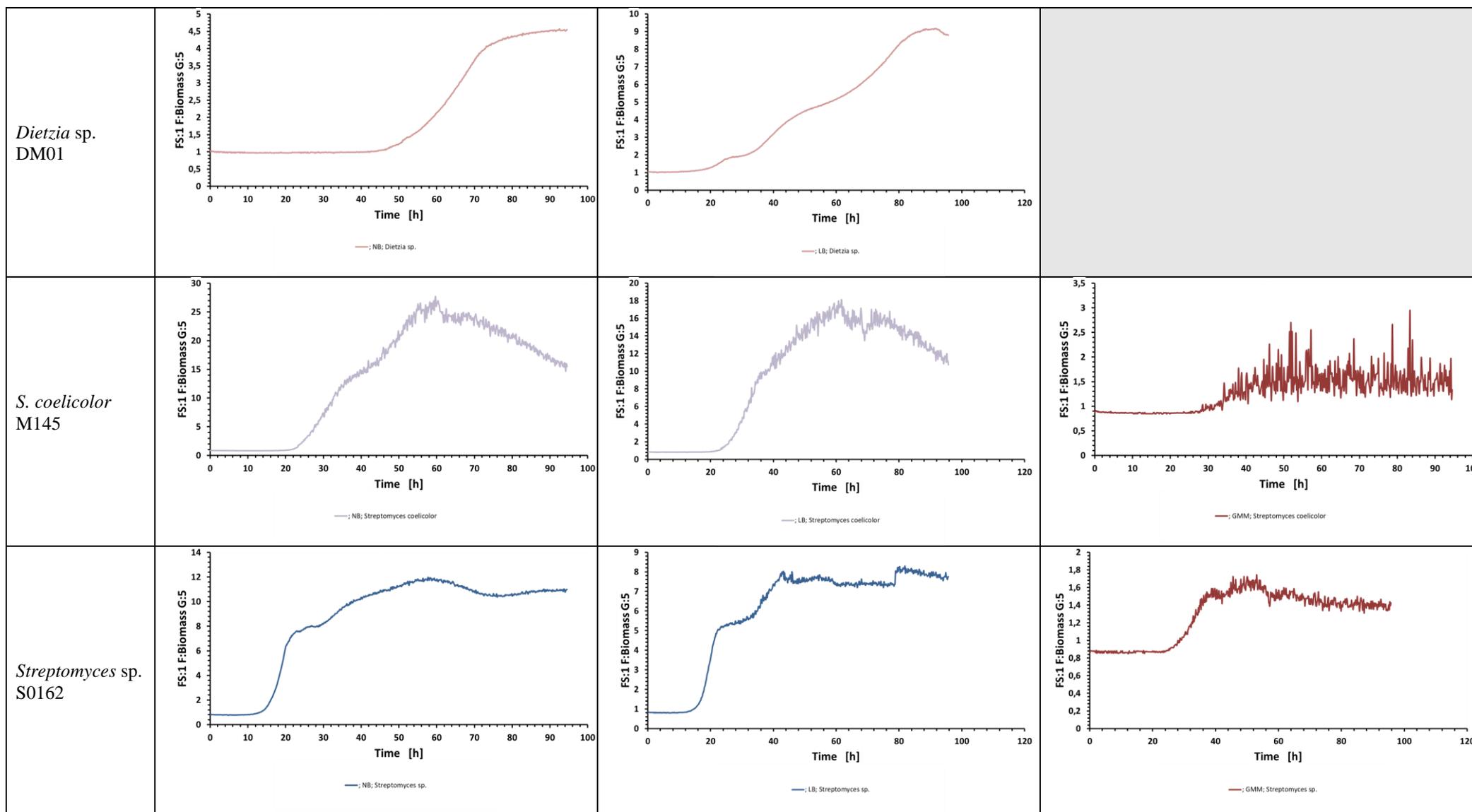


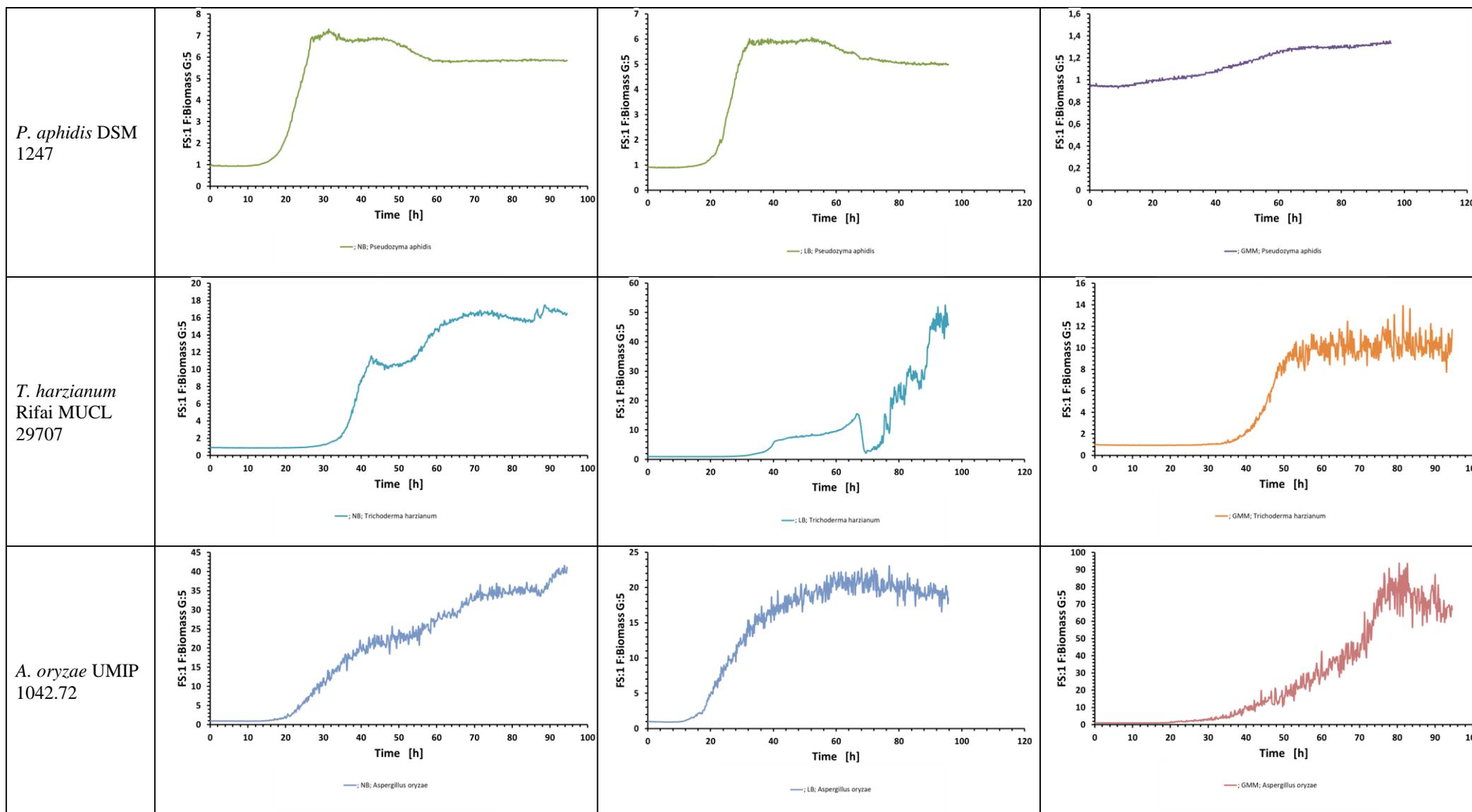
Tableau A-2 : Courbes de croissance des 10 microorganismes sélectionnés dans les trois conditions de milieu (NB, LB, GMM) dans le BioLector :
2nd run.

Espèce	Milieu NB	Milieu LB	Milieu GMM
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	<p>—; NB; Bacillus subtilis</p>	<p>—; LB; Bacillus subtilis</p>	
<i>P. syringae</i> DSM 10604	<p>—; NB; Pseudomonas syringae</p>	<p>—; LB; Pseudomonas syringae</p>	

Annexe A



Annexe A



Annexe A

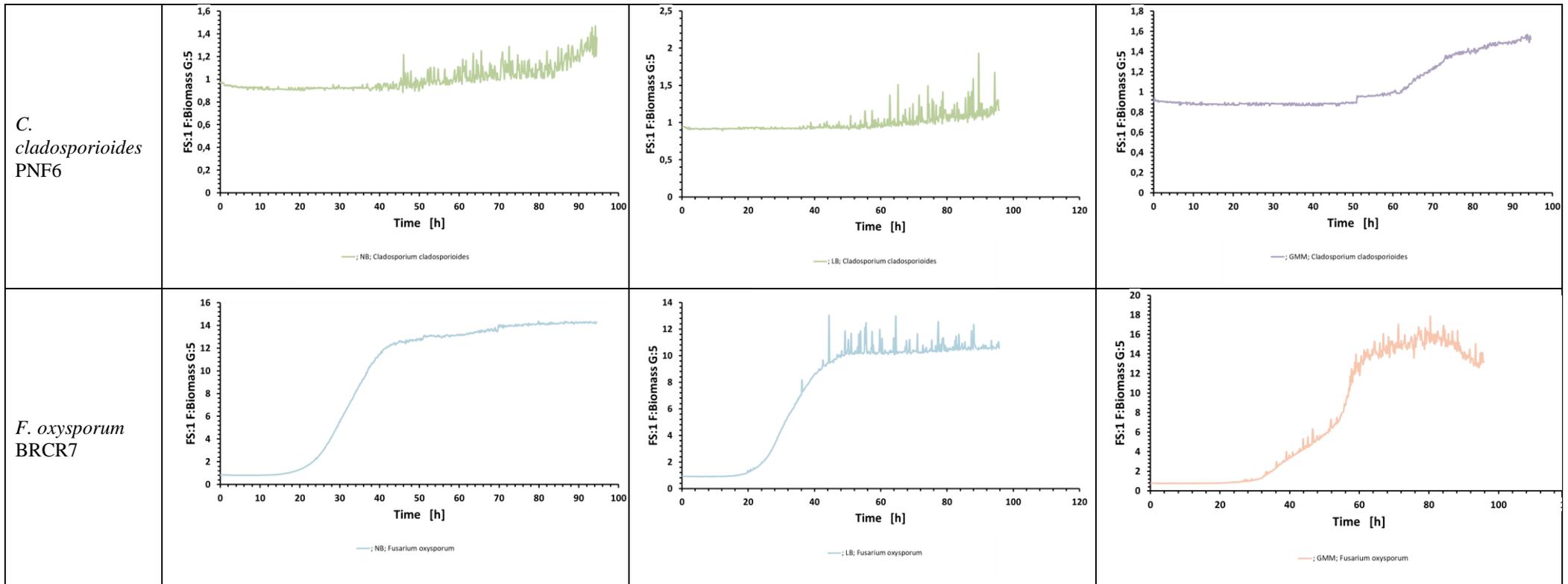
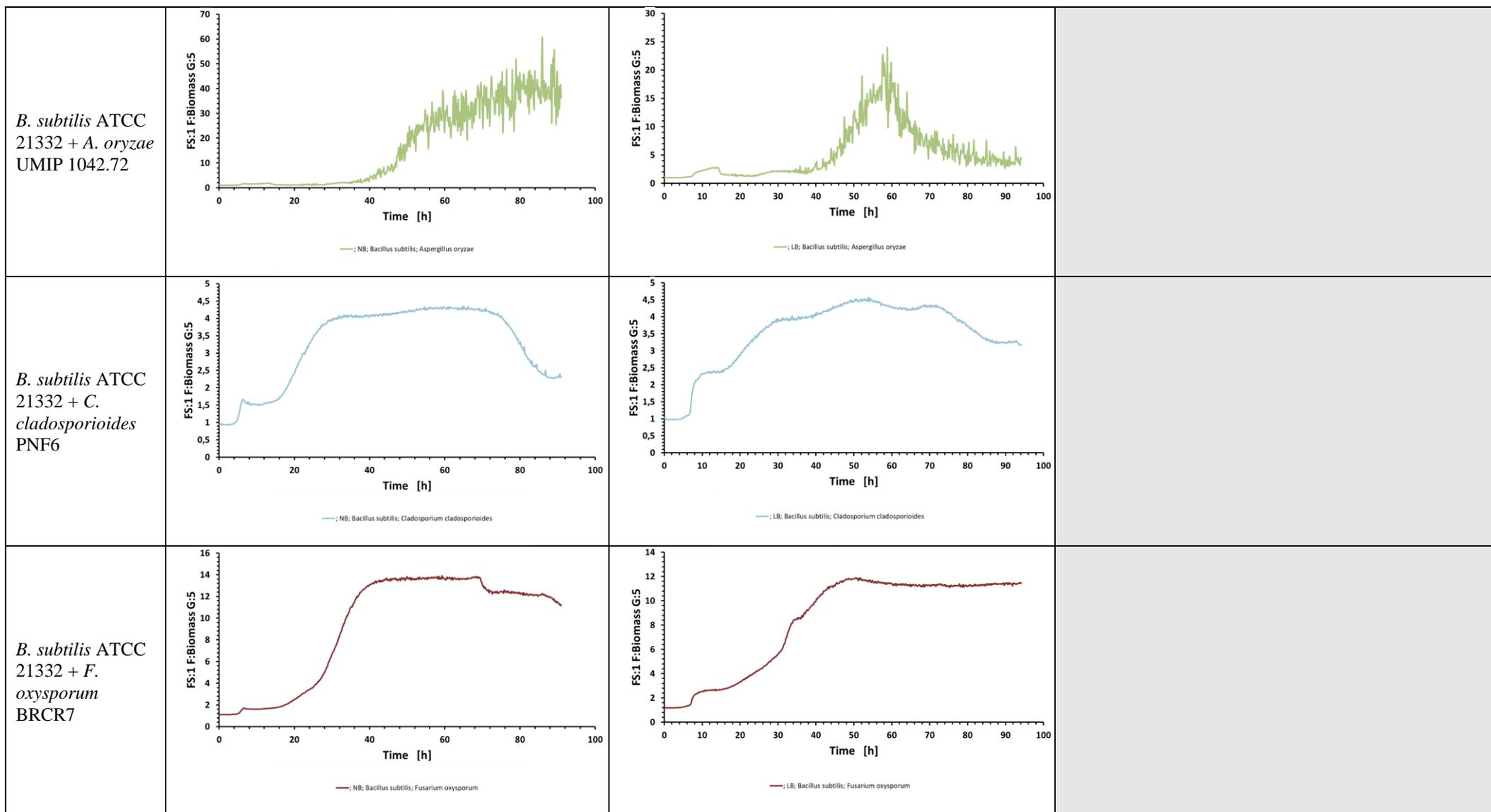


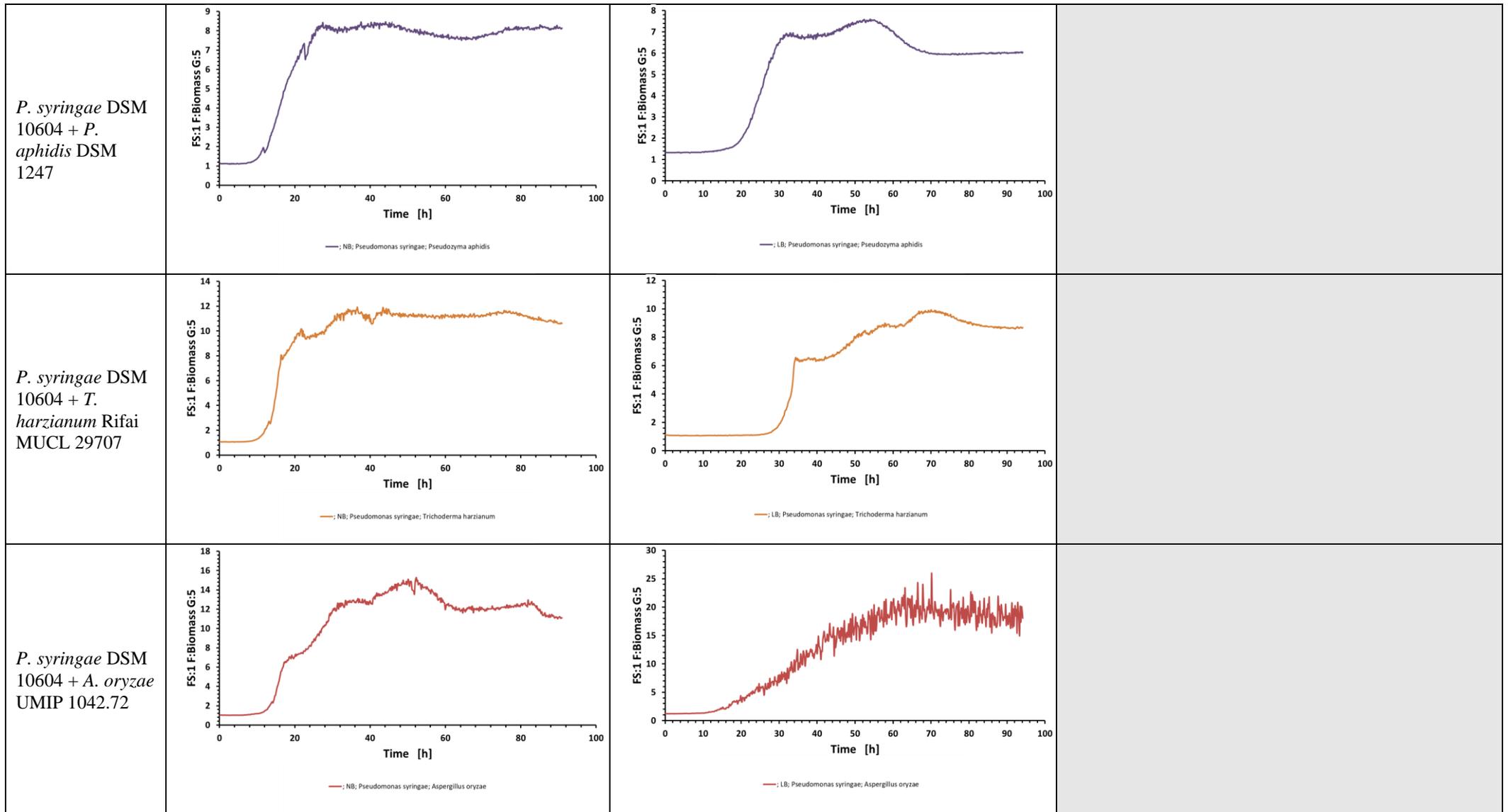
Tableau A-3 : Développement observé des co-cultures réalisées dans le BioLector. Les courbes de croissance montrent le développement des microorganismes dans les puits contenant la bactérie et le champignon testés, dans les milieux riches (LB, NB) et minimum (GMM) pour les co-cultures impliquant les *Streptomyces*.

Co-culture	Milieu NB	Milieu LB	Milieu GMM
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332 + <i>P. aphidis</i> DSM 1247	<p>—; NB; Bacillus subtilis; Pseudozyma aphidis</p>	<p>—; LB; Bacillus subtilis; Pseudozyma aphidis</p>	
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332 + <i>T. harzianum</i> Rifai MUCL 29707	<p>—; NB; Bacillus subtilis; Trichoderma harzianum</p>	<p>—; LB; Bacillus subtilis; Trichoderma harzianum</p>	

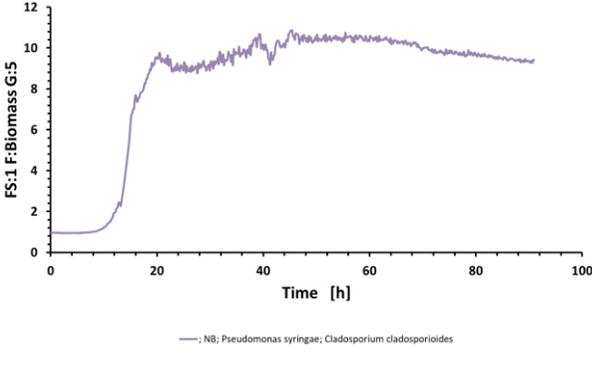
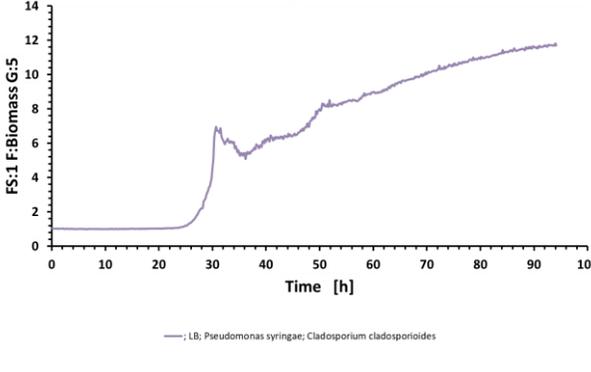
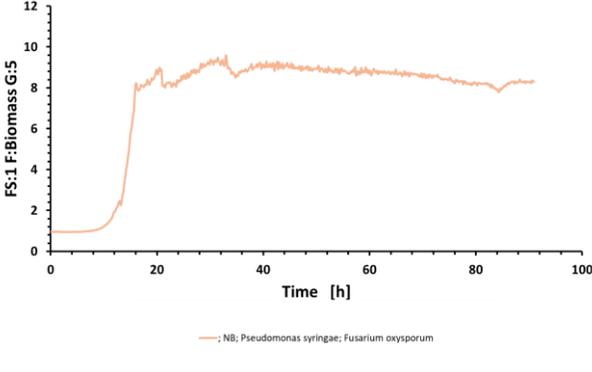
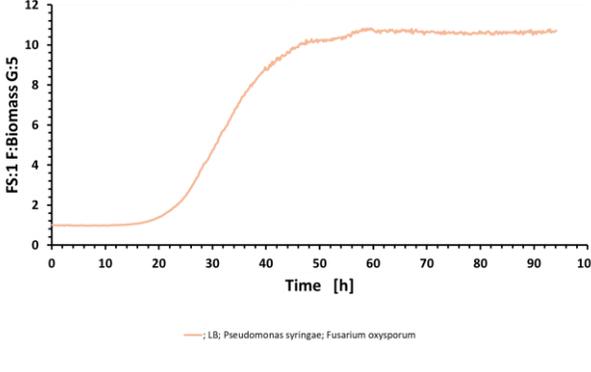
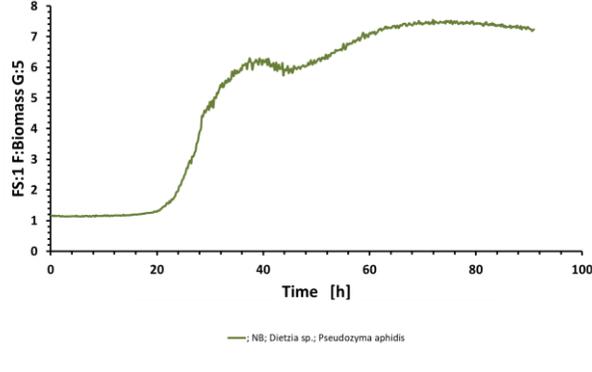
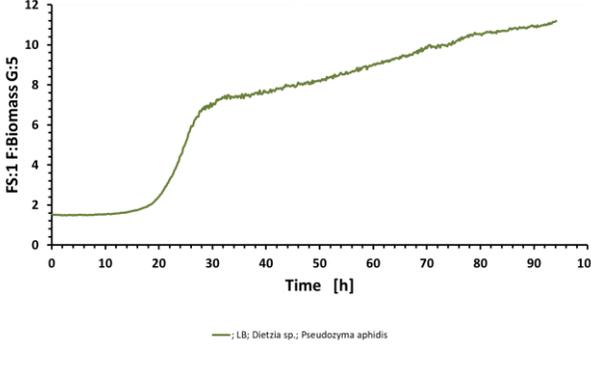
Annexe A



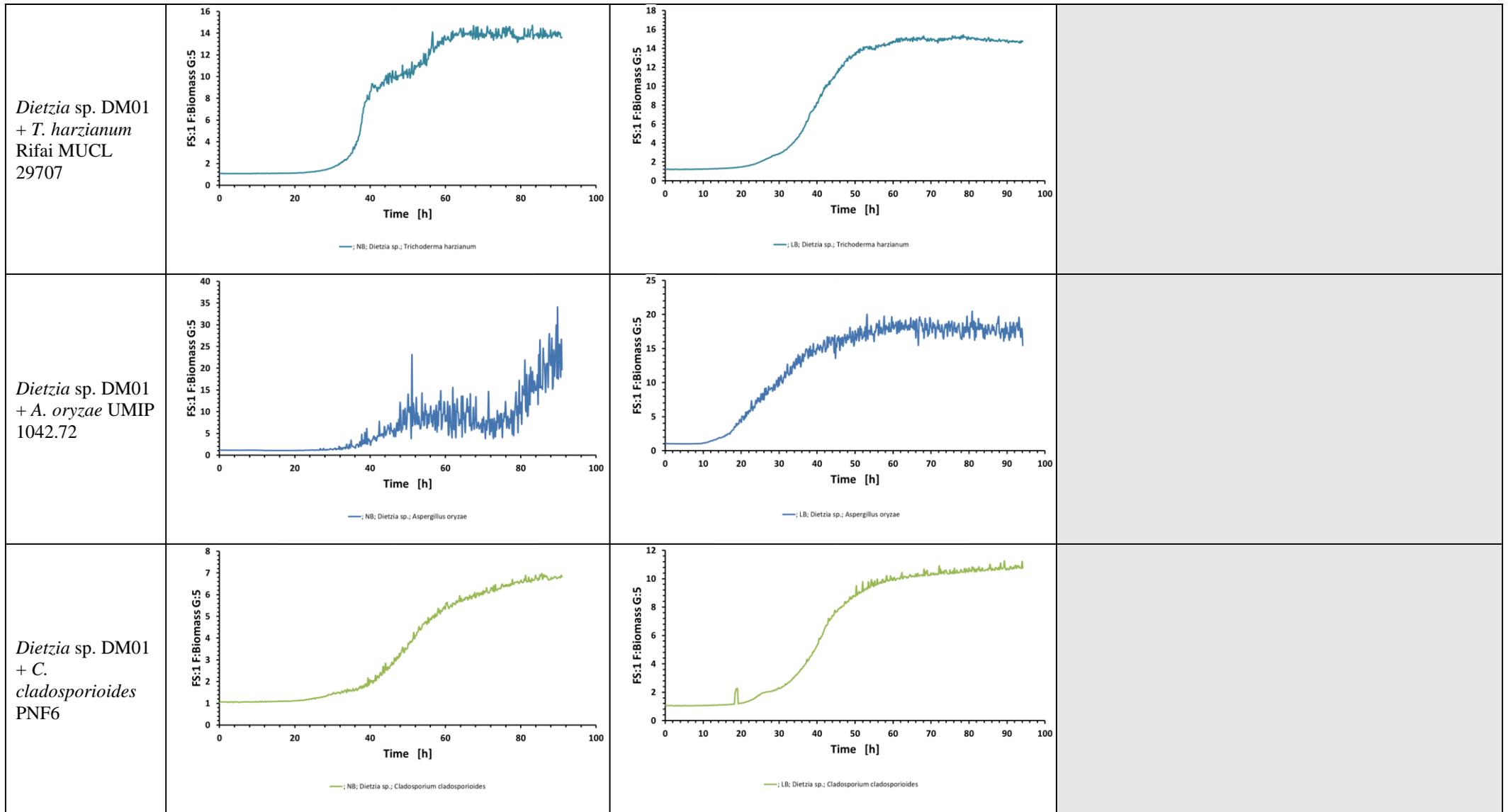
Annexe A



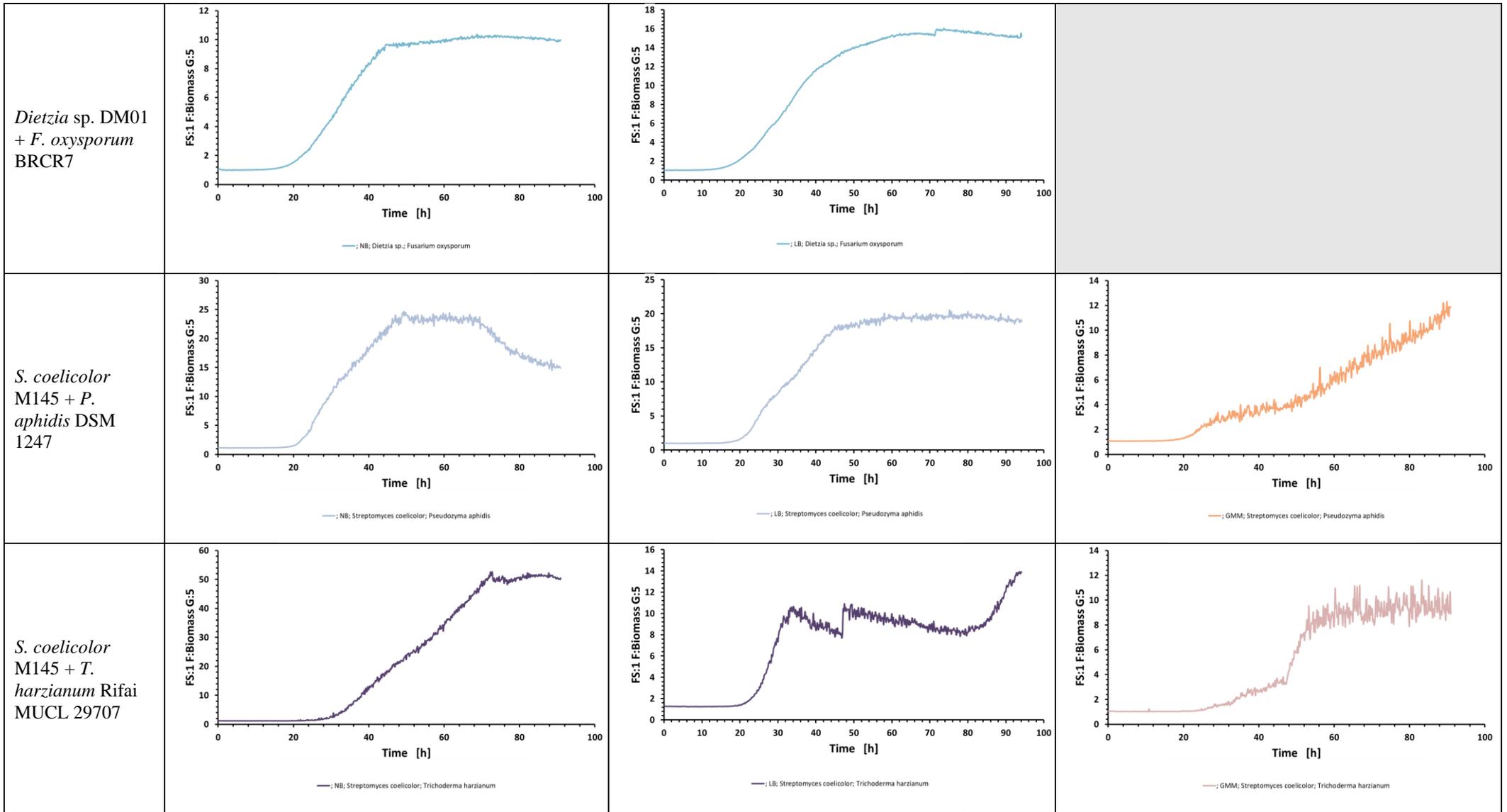
Annexe A

<p><i>P. syringae</i> DSM 10604 + <i>C. cladosporioides</i> PNF6</p>	 <p>—; NB; <i>Pseudomonas syringae</i>; <i>Cladosporium cladosporioides</i></p>	 <p>—; LB; <i>Pseudomonas syringae</i>; <i>Cladosporium cladosporioides</i></p>	
<p><i>P. syringae</i> DSM 10604 + <i>F. oxysporum</i> BR7</p>	 <p>—; NB; <i>Pseudomonas syringae</i>; <i>Fusarium oxysporum</i></p>	 <p>—; LB; <i>Pseudomonas syringae</i>; <i>Fusarium oxysporum</i></p>	
<p><i>Dietzia</i> sp. DM01 + <i>P. aphidis</i> DSM 1247</p>	 <p>—; NB; <i>Dietzia</i> sp.; <i>Pseudozyma aphidis</i></p>	 <p>—; LB; <i>Dietzia</i> sp.; <i>Pseudozyma aphidis</i></p>	

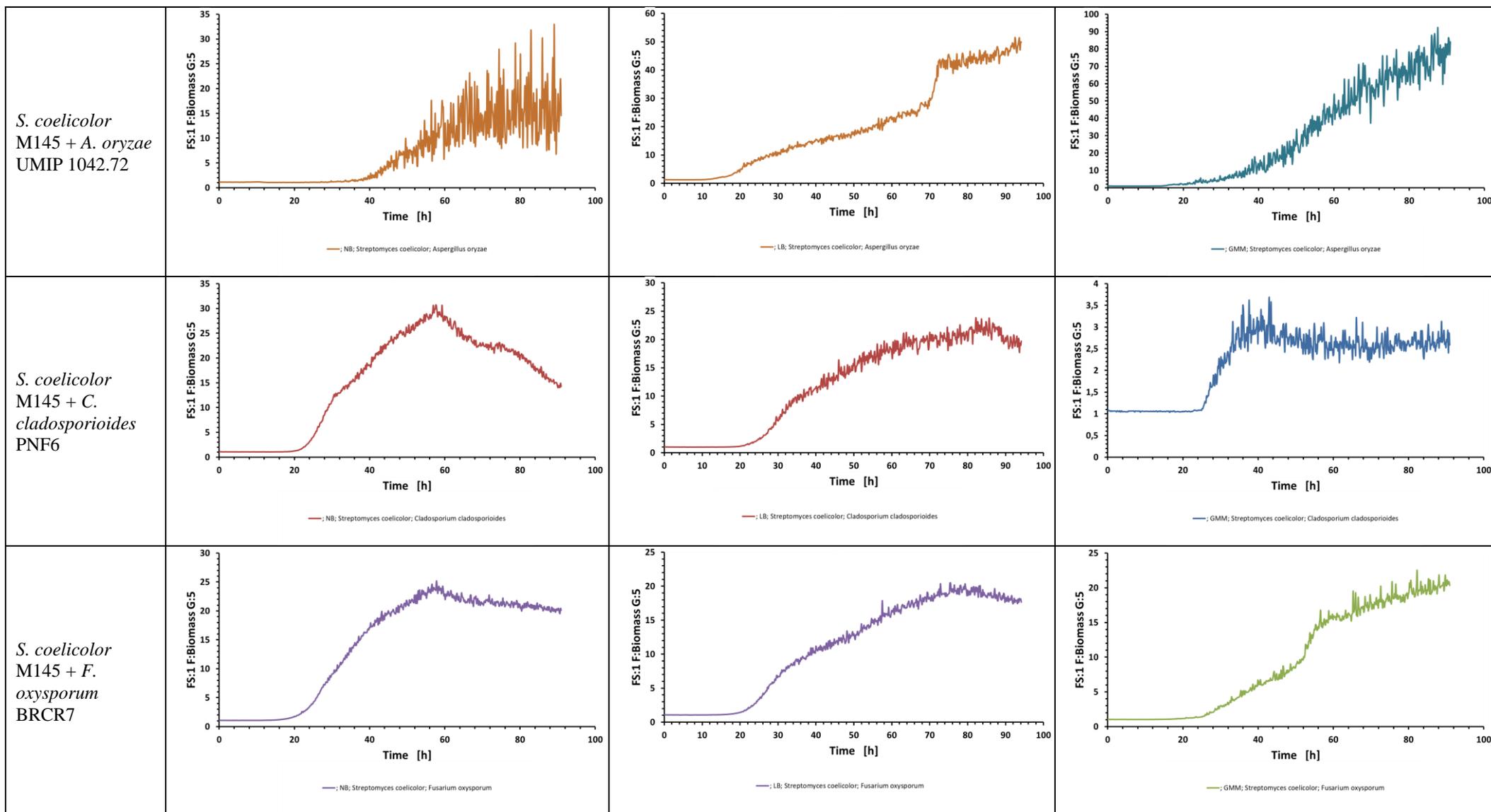
Annexe A



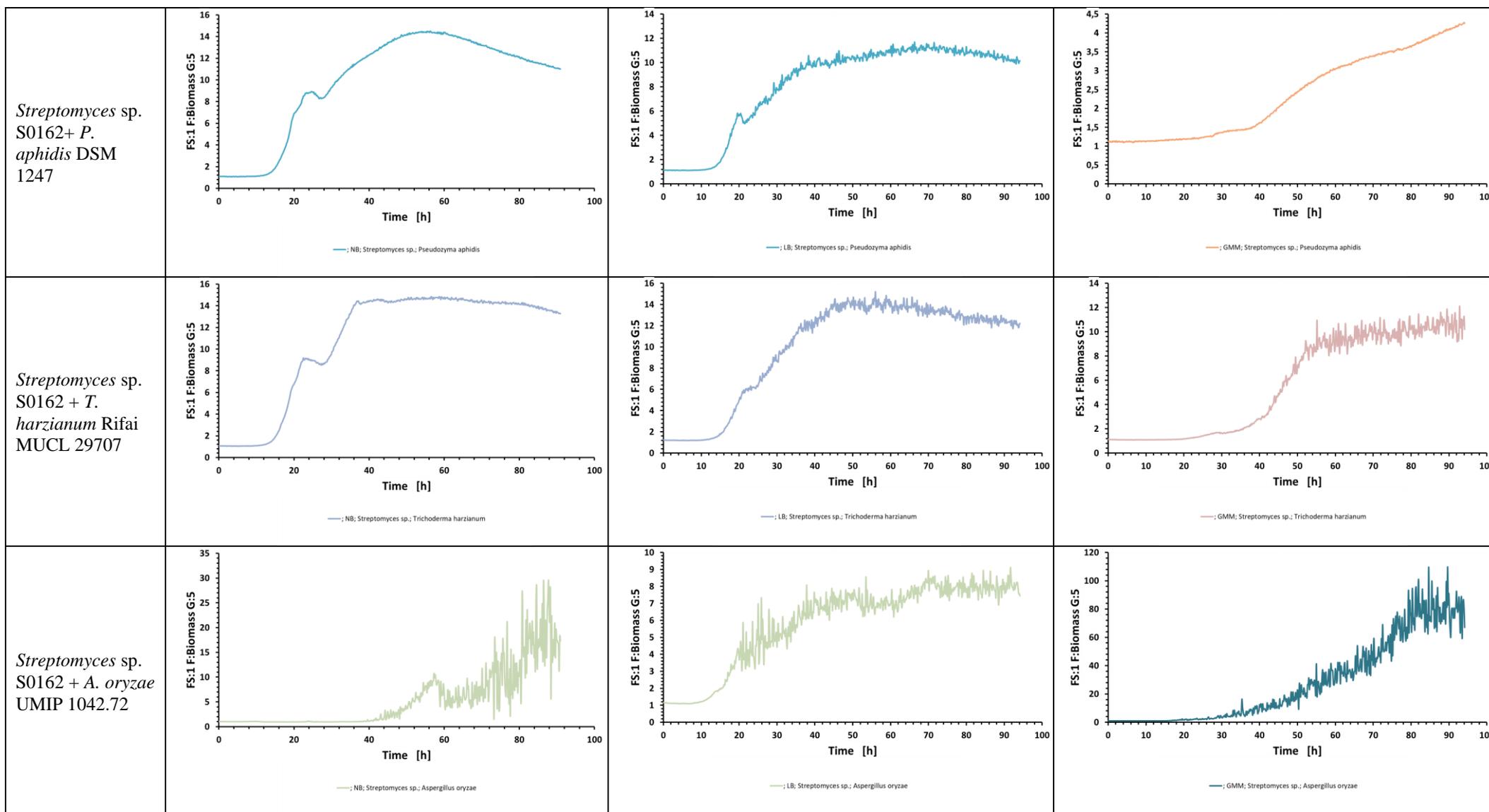
Annexe A



Annexe A



Annexe A



Annexe A

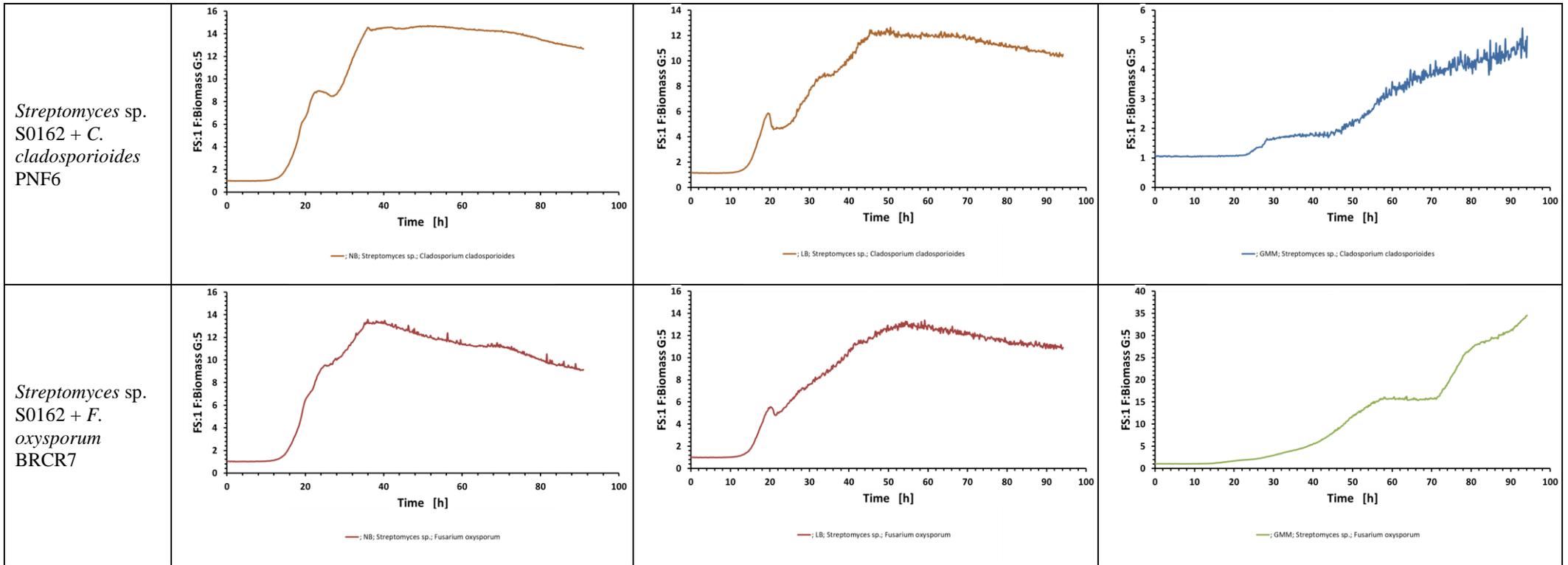
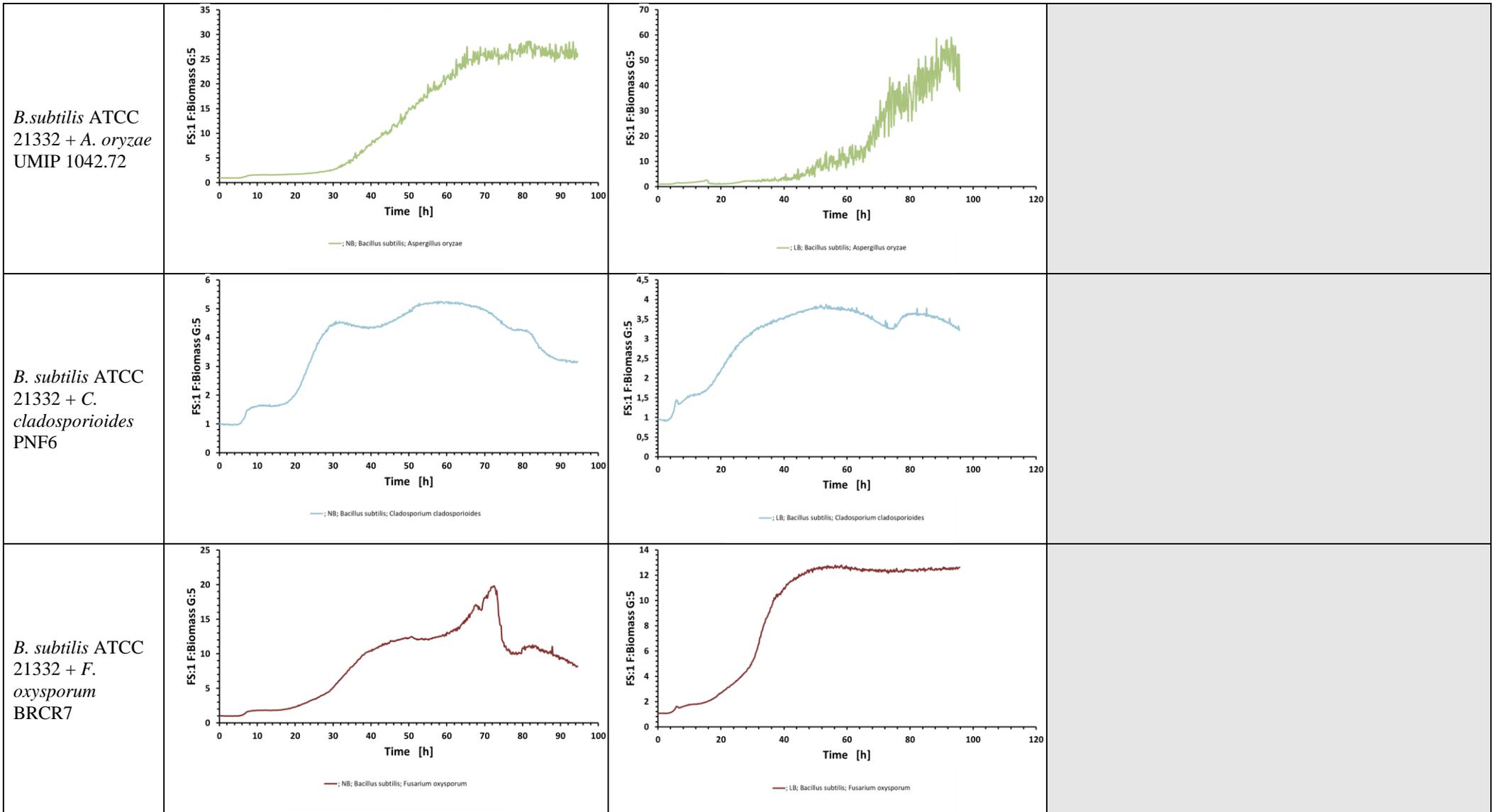


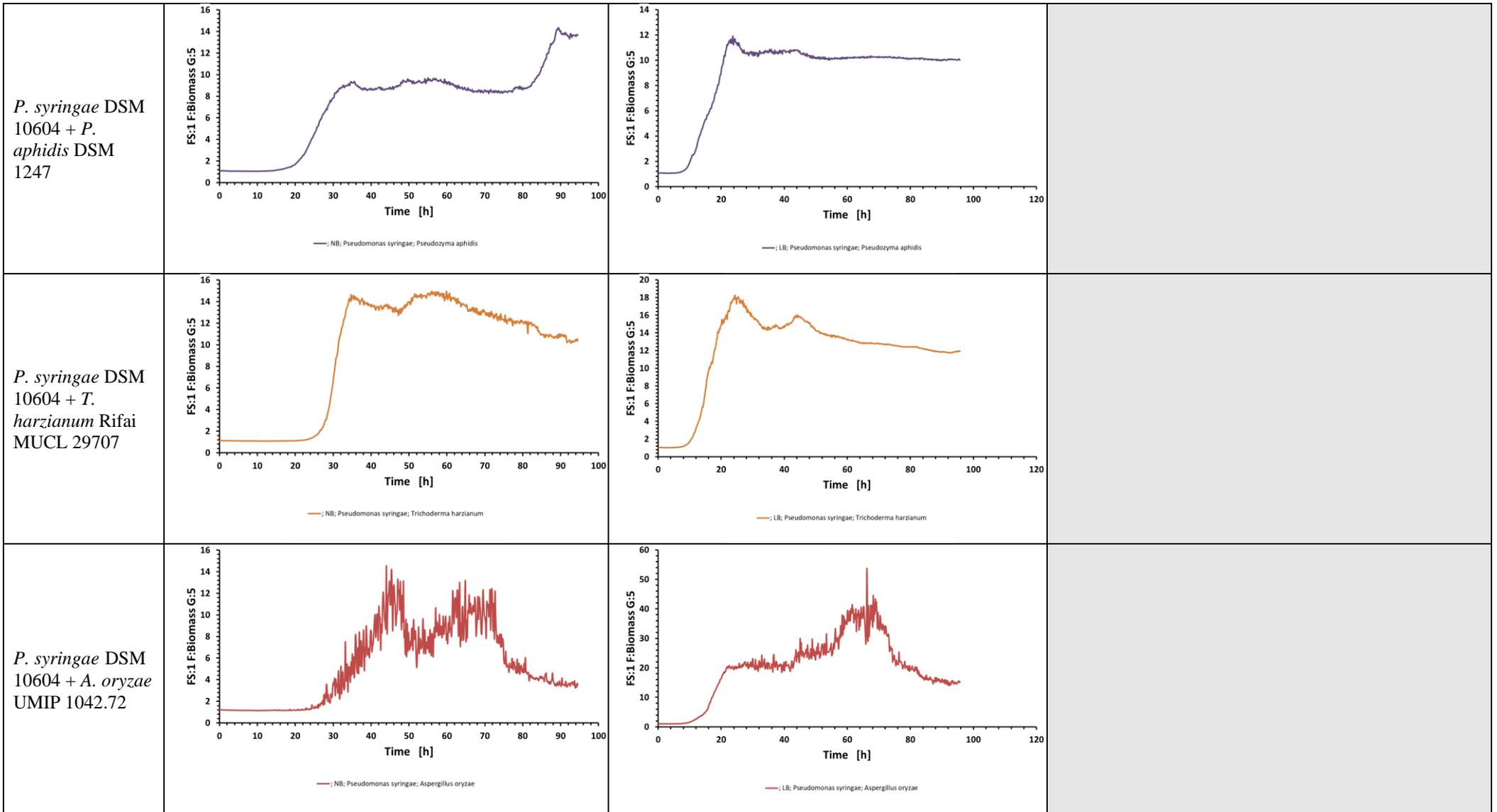
Tableau A-4 : Développement observé des co-cultures réalisées dans le BioLector. Les courbes de croissance montrent le développement des microorganismes dans les puits contenant la bactérie et le champignon testés, dans les milieux riches (LB, NB) et minimum (GMM) pour les co-cultures impliquant les *Streptomyces*, 2nd run.

Co-culture	Milieu NB	Milieu LB	Milieu GMM
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332 + <i>P. aphidis</i> DSM 1247	<p>—; NB; Bacillus subtilis; Pseudozyma aphidis</p>	<p>—; LB; Bacillus subtilis; Pseudozyma aphidis</p>	
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332 + <i>T. harzianum</i> Rifai MUCL 29707	<p>—; NB; Bacillus subtilis; Trichoderma harzianum</p>	<p>—; LB; Bacillus subtilis; Trichoderma harzianum</p>	

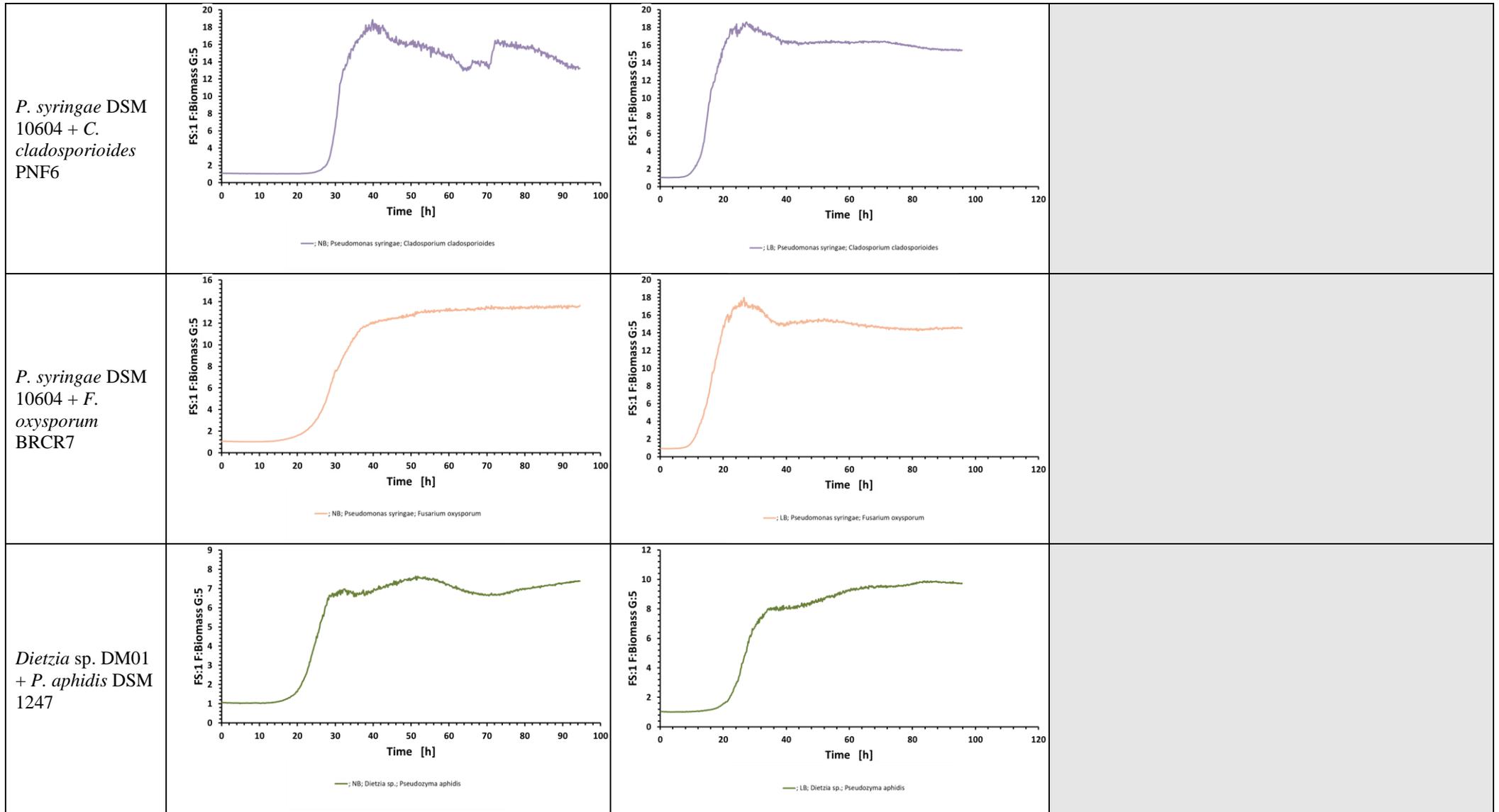
Annexe A



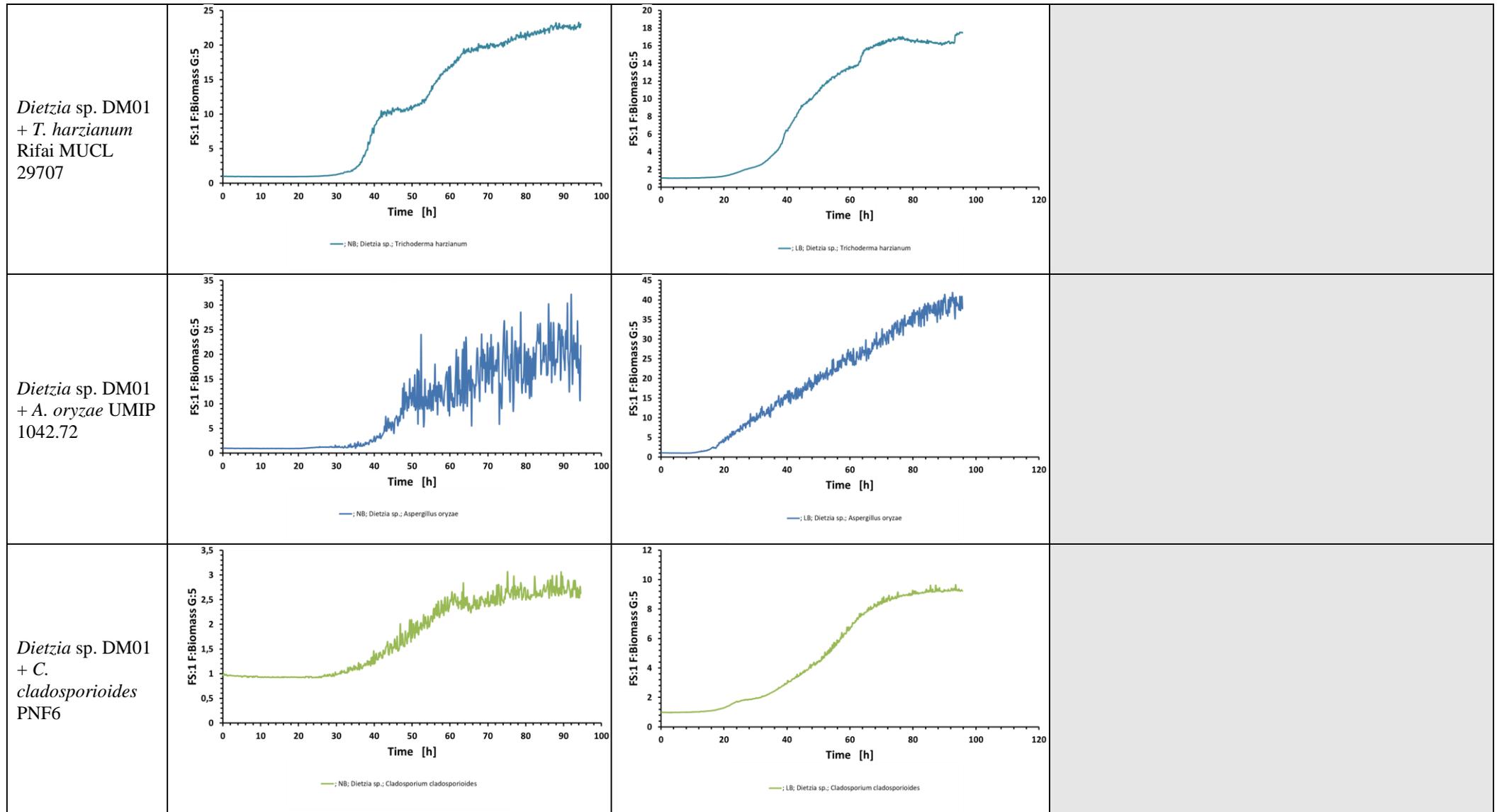
Annexe A



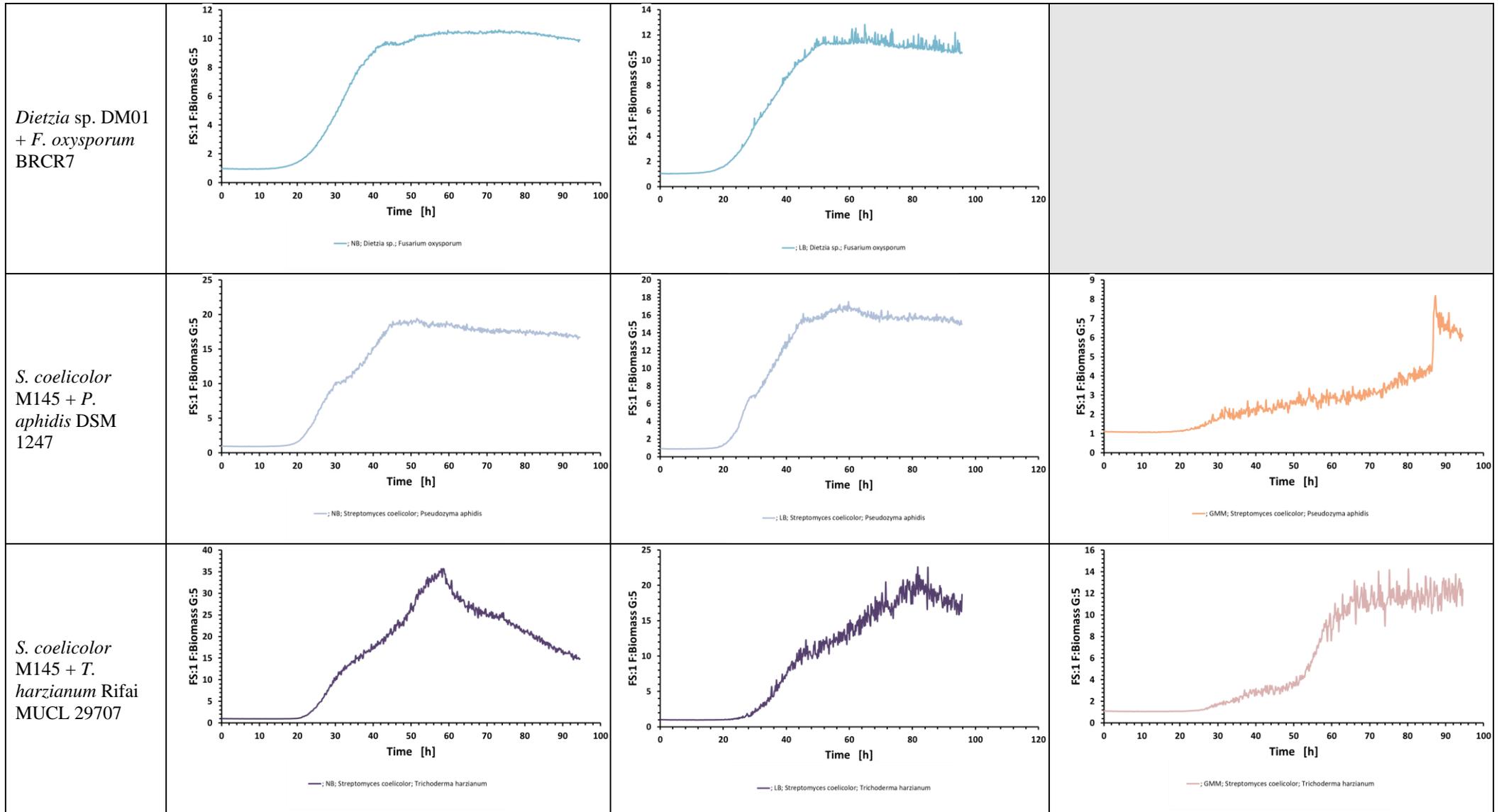
Annexe A



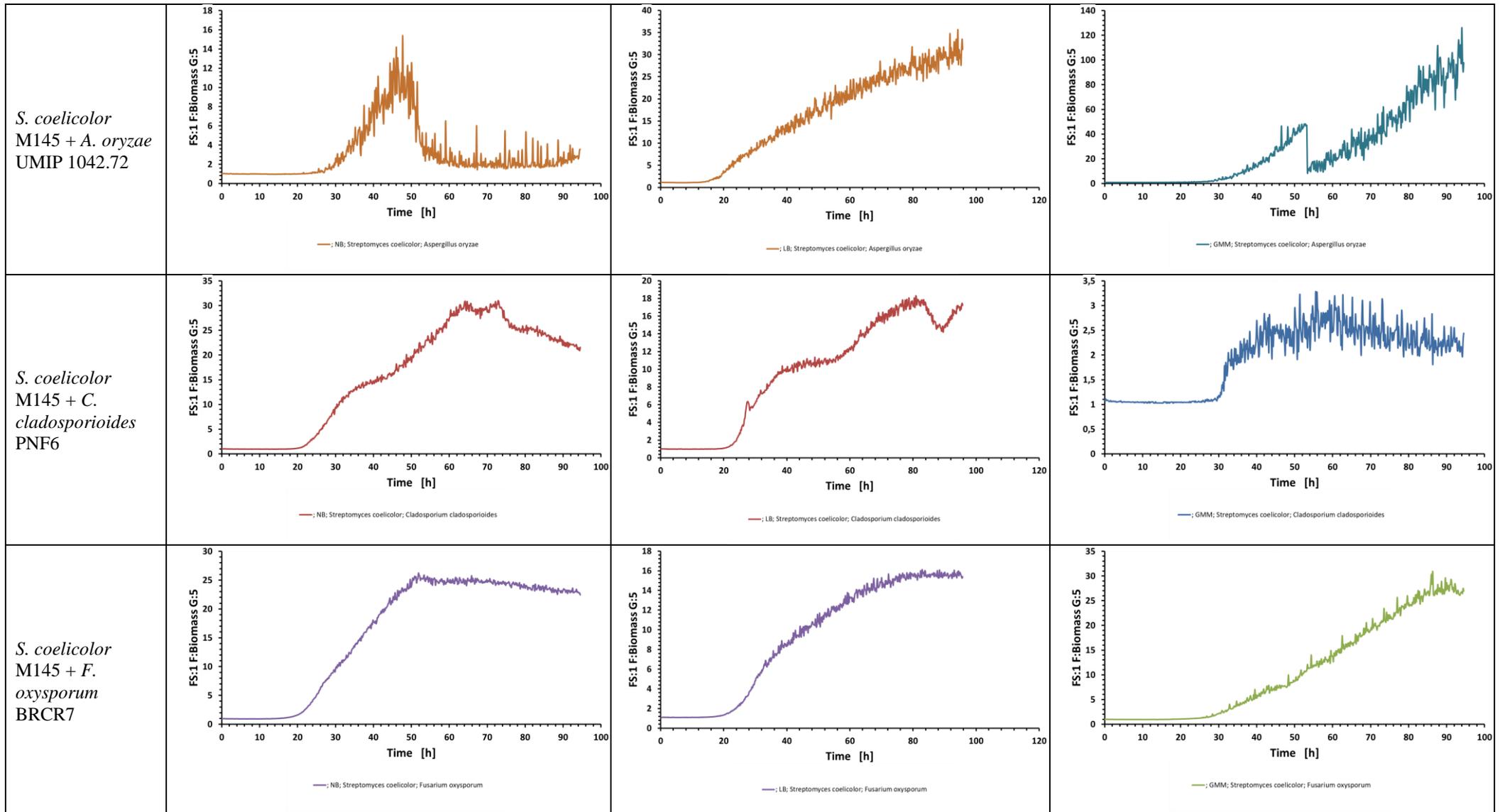
Annexe A



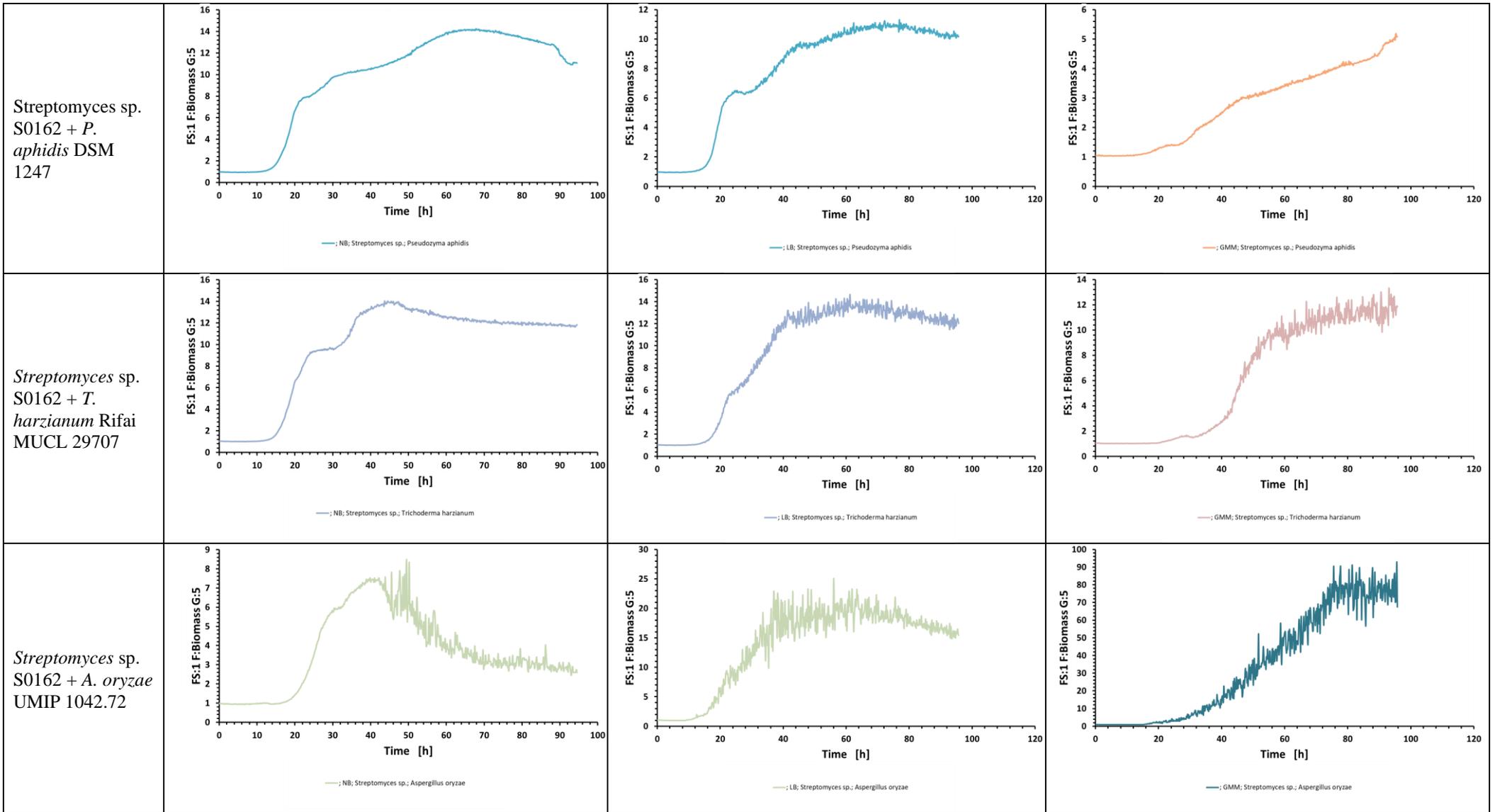
Annexe A



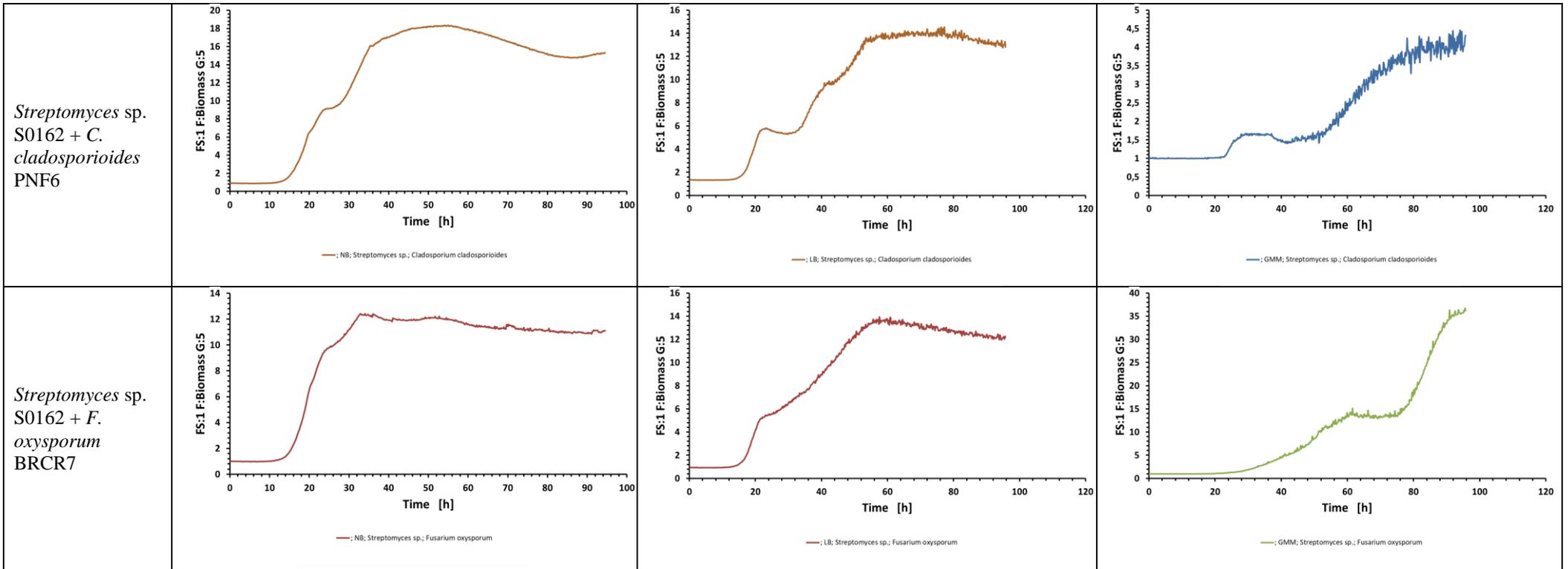
Annexe A



Annexe A



Annexe A



B. Informations complémentaires du chapitre 4

Ces annexes correspondent aux résultats avancés dans le chapitre 4 : tableaux de BGC déterminés à l'URCA pour *Streptomyces* sp. S0162, *C. cladosporioides* PNF6 et *P. syringae* DSM 10604 (Chapitre 4 partie 3.1), ainsi qu'aux spectres réalisés en Q-TOF pour les co-cultures et monocultures suivantes (Chapitre 4 partie 3.2.1) :

- Les monocultures : *P. syringae* DSM 10604, *Streptomyces* sp. S0162, *A. oryzae* UMIP 1042.72, *C. cladosporioides* PNF6 ;
- Et les co-cultures : *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*

Tableau B-1 : Tableau des BGC codant pour des métabolites secondaires identifiés chez *Streptomyces* sp. S0162.

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'						
Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 4.1	siderophore	137,21 8	148,996	desferrioxamin B	Other	100%
Region 7.1	T1PKS,NRPS	1	46,492	SGR PTMs	NRP + Polyketide	100%
Region 7.4	melanin	279,94 2	290,442	melanin	Other	100%
Region 7.5	T3PKS	322,60 9	349,054	alkylresorcinol	Polyketide	100%
Region 11.2	lanthipeptide-class-iii	136,60 5	159,223	AmfS	RiPP:Lanthipeptide	100%
Region 25.3	terpene	79,661	105,263	isorenieratene	Terpene	100%
Region 27.1	ectoine	47,82	58,218	ectoine	Other	100%
Region 32.1	lassopeptide	35,784	58,469	keywimysin	RiPP	100%
Region 42.1	lanthipeptide-class-ii	17,592	39,416	SRO15-3108	RiPP:Lanthipeptide	100%
Region 18.2	NRPS	84,119	131,402	streptobactin	NRP	94%
Region 18.1	melanin,NRPS	12,012	63,031	coelichelin	NRP	81%
Region 9.1	terpene	259,01 5	285,587	hopene	Terpene	69%
Region 20.1	lanthipeptide-class-iii	74,619	97,336	catenulipeptin	RiPP:Lanthipeptide	60%
Region 56.1	T1PKS	1	4,219	griseochelin	Polyketide	53%
Region 11.1	NRPS,ladderane,other,T 3PKS,terpene	1	86,78	ishigamide	NRP + Polyketide	50%
Region 12.1	NRPS,betalactone	244,23 6	275,076	ulleungmycin	NRP	50%
Region 3.2	T2PKS,oligosaccharide	213,11	285,586	cytorhodin	Polyketide	47%
Region 1.1	NRPS,T1PKS,NRPS-like	250,97 6	323,605	stenothricin	NRP:Cyclic depsipeptide	40%

Annexe B

Region 10.2	NRPS	257,84 8	283,424	ulleungmycin	NRP	33%
Region 25.4	NRPS,T1PKS,thiopeptide ,LAP	109,62 8	144,534	lactazole	RiPP:Thiopeptide	33%
Region 22.1	T1PKS,butyrolactone	5,149	71,656	argimycin PI / argimycin PII / nigrifactin / argimycin PIV / argimycin PV / argimycin PVI / argimycin PIX	Polyketide:Modular type I	24%
Region 54.1	T1PKS	1	4,404	aculeximycin	Polyketide	23%
Region 5.1	NRPS-like	120,24 1	163,699	diazaquinomycin A / diazaquinomycin E / diazaquinomycin F / diazaquinomycin G	Other:Shikimate- derived	20%
Region 1.2	terpene	428,67 4	449,741	steffimycin D	Polyketide:Type II + Saccharide:Hybrid/ tailoring	19%
Region 5.2	betalactone	342,97 5	362,487	asukamycin	Polyketide:Type II	19%
Region 25.1	terpene	1	19,761	elaiophylin	Polyketide	16%
Region 25.2	butyrolactone	46,299	57,249	coelimycin P1	Polyketide:Modular type I	12%
Region 34.1	furan,butyrolactone	55,962	77,32	colabomycin E	Polyketide:Type II	9%
Region 10.1	NRPS	116,62 2	158,668	azicemicin B	Polyketide	8%
Region 14.1	NRPS,T1PKS	1	48,512	polyoxypeptin	NRP + Polyketide	8%
Region 16.1	betalactone	130,27 9	157,919	divergolide A / divergolide B / divergolide C / divergolide D	Polyketide:Modular type I	6%
Region 26.1	T3PKS	62,388	103,506	herboxidiene	Polyketide	6%
Region 38.1	NRPS	1	24,859	oxalomycin B	NRP + Polyketide	6%
Region 7.3	T3PKS,NRPS	167,79 8	235,645	olimycin A / olimycin B	Polyketide	5%
Region 46.1	NRPS,NRPS-like	1	15,996	A54145	NRP	5%

Annexe B

Region 8.1	NRPS-like,betalactone	27,046	70,639	LL-D49194 α 1 (LLD)	Polyketide	3%
Region 37.1	hglE-KS	1	50,652	A54145	NRP	3%
Region 2.1	terpene	120,025	141,122			
Region 3.1	RiPP-like	3,097	14,395			
Region 3.3	siderophore	382,565	397,389			
Region 4.2	lanthipeptide-class-iii,lanthipeptide-class-ii	216,148	247,27			
Region 7.2	RiPP-like	78,705	89,502			
Region 19.1	terpene	11,314	32,321			
Region 22.2	lassopeptide	123,959	146,49			
Region 24.1	NRPS	120,463	145,27			
Region 40.1	NRPS-like	1	29,339			
Region 51.1	T1PKS	1	7,291			
Region 57.1	T1PKS	1	4,1			
Region 58.1	NRPS	1	2,74			

Tableau B-2 : Tableau des BGC codant pour des métabolites secondaires identifiés chez *Pseudomonas syringae* DSM 10604.

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'						
Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 2.1	NRPS	3	71,886	nunapeptin / nunamycin	NRP	100%
Region 12.2	NRPS	150,485	180,566	rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	NRP	100%
Region 16.1	NRPS,T1PKS	14,506	71,152	syringolin A	NRP + Polyketide	100%
Region 44.1	NRPS	1	6,036	rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	NRP	100%
Region 47.1	NRPS	1	2,867	xenotetrapeptide	NRP	100%
Region 49.1	NRPS	1	2,606	rhizomide A / rhizomide B / rhizomide C	NRP	100%
Region 2.2	siderophore, NRPS	80,675	162,138	syringafactin	NRP	66%
Region 24.1	NRPS	1	32,09	corpeptin A / corpeptin B	NRP	63%
Region 11.1	aryl polyene	132,79	176,389	aryl polyenes	Other	38%
Region 29.1	NRPS, NRPS-like	1	49,012	putisolvin	NRP	37%
Region 31.1	NRPS-like	5,686	29,558	fragin	NRP	37%
Region 9.1	NRPS	6,762	68,068	rimosamide	NRP	14%
Region 15.1	NRPS-like	125,744	148,921	jagaricin	NRP	13%
Region 30.1	redox-cofactor	24,925	41,241	lankacidin C	NRP + Polyketide	13%
Region 9.2	NRPS	182,578	225,399	pyoverdin	NRP	12%
Region 33.1	NRPS-like	1	21,884	pyoverdin	NRP	10%
Region 37.1	NRPS	1	16,639	pyoverdin	NRP	3%
Region 43.1	NRPS, NRPS-like	1	7,217	pyoverdin	NRP	3%
Region 1.1	transAT-PKS	283,47	350,367			
Region 5.1	transAT-PKS, NRPS-like, hserlactone	43,265	104,724			
Region 12.1	NAGGN	125,92	140,564			
Region 19.1	NAPAA	1	27,13			

Tableau B-3 : Tableau des BGC codant pour des métabolites secondaires identifiés chez *Cladosporium cladosporioides* PNF6.

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'						
Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 23.1	T1PKS	250,483	297,081	melanin	Polyketide	100%
Region 10.1	T1PKS	948,515	998,283	cercosporin	Polyketide	25%
Region 4.1	T1PKS	287,015	336,201	monacolin K	Polyketide	22%
Region 40.1	T1PKS	17,465	83,277	neosartorin	Polyketide	21%
Region 2.1	NRPS-like	2,206,569	2,251,827			
Region 4.2	NRPS	953,574	997,742			
Region 4.3	NRPS-like	1,813,072	1,857,297			
Region 5.1	T1PKS	1,755,668	1,803,783			
Region 6.1	T1PKS	481,929	529,123			
Region 6.2	terpene	1,953,238	1,974,794			
Region 7.1	terpene	179,479	200,825			
Region 7.2	NRPS-like	1,024,800	1,063,641			
Region 7.3	NRPS	1,641,999	1,694,803			
Region 9.1	NRPS-like	680,797	720,117			
Region 9.2	NRPS	726,279	783,384			
Region 10.2	NRPS	1,182,459	1,230,907			
Region 13.1	fungal- RiPP, NRPS	96,905	157,885			
Region 14.1	NRPS-like	437,982	481,045			
Region 18.1	NRPS	447,343	490,105			
Region 19.1	NRPS-like	455,388	498,743			
Region 21.1	NRPS	30,995	74,945			
Region 22.1	betalactone	246,844	271,187			
Region 24.1	terpene	11,030	32,927			
Region 33.1	NRPS-like	77,318	121,190			
Region 34.1	terpene	3,896	25,302			

Annexe B

Region 34.2	T1PKS	70,793	119,106
Region 45.1	NRPS-like	9,208	52,717

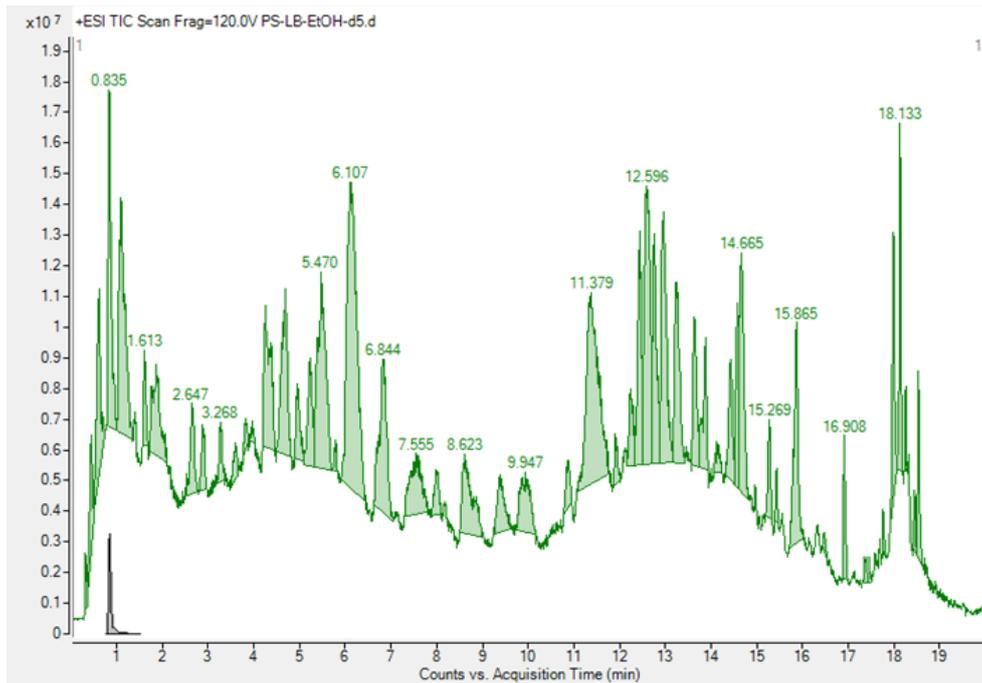


Figure B-1 : Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la monoculture *Pseudomonas syringae* DSM 10604 en milieu LB.

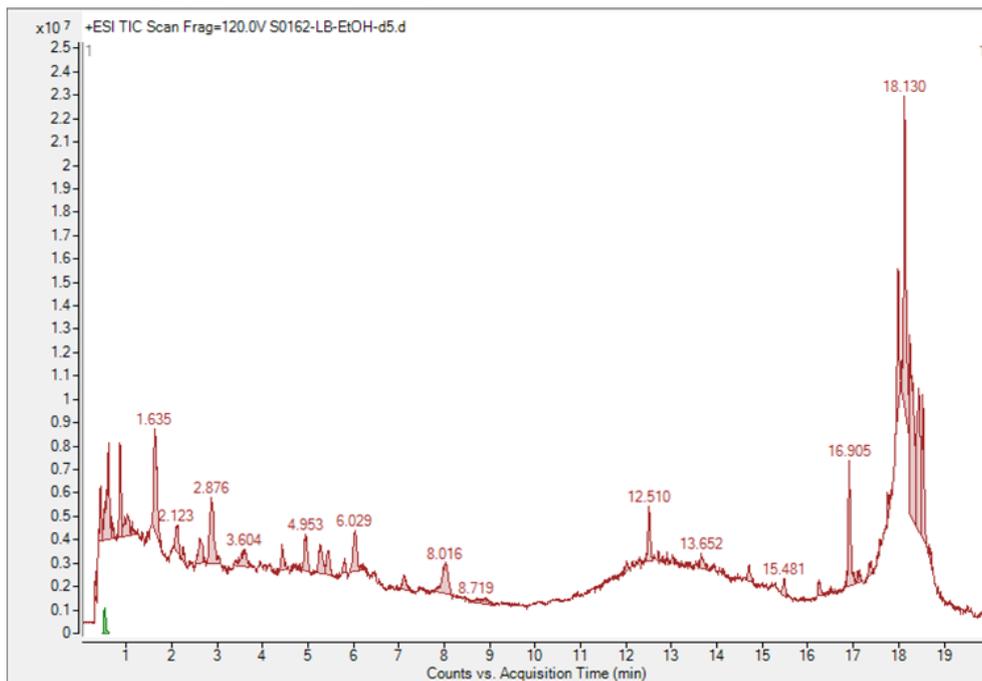


Figure B-2 : Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la monoculture de *Streptomyces* sp. S0162 en milieu LB.

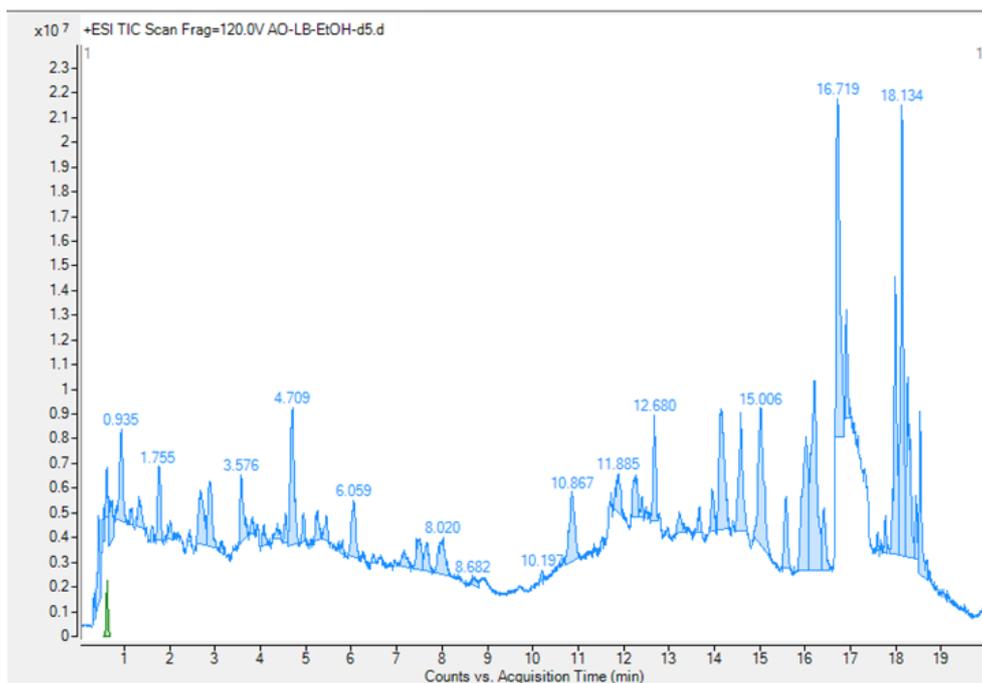


Figure B-3: Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la monoculture d'*Aspergillus oryzae* UMIP 1042.72 en milieu LB.

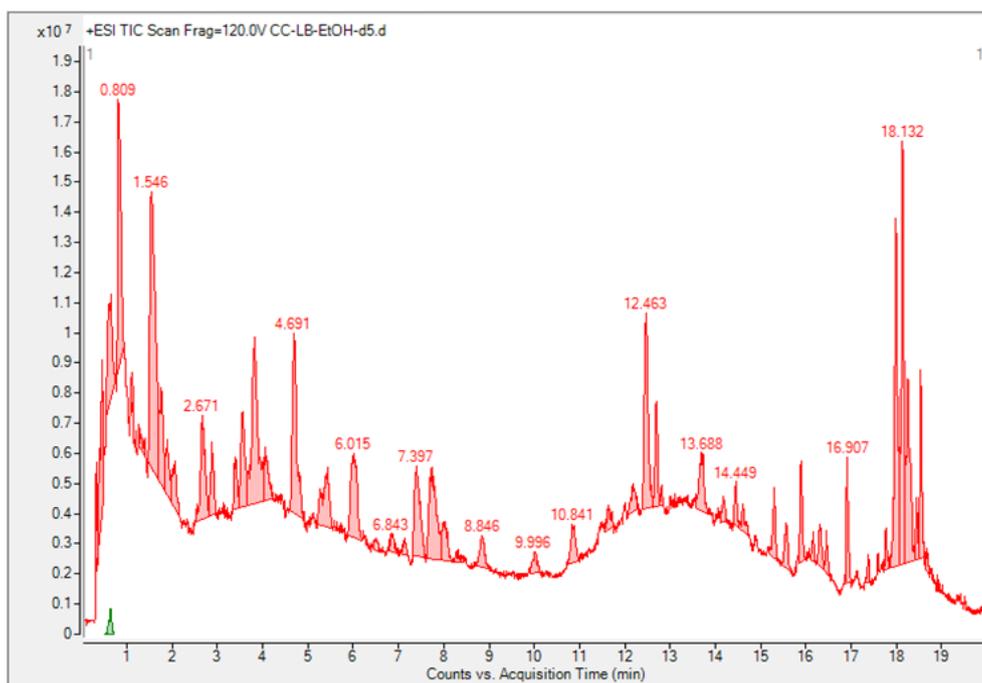


Figure B-4: Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la monoculture de *Cladosporium cladosporioides* PNF6 en milieu LB.

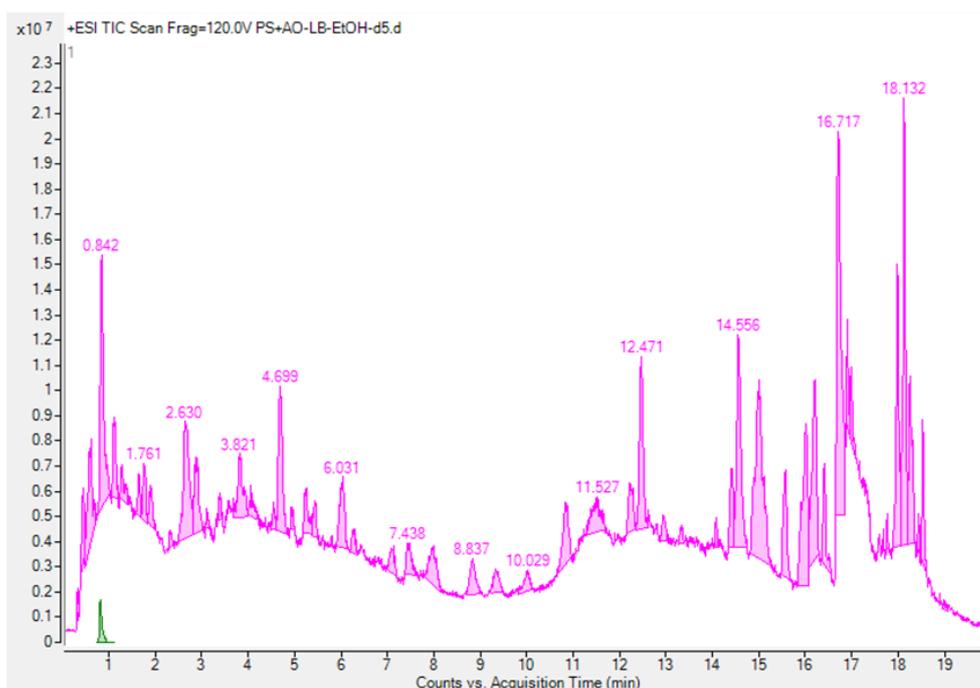


Figure B-5 : Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la co-culture de *Pseudomonas syringae* + *Aspergillus oryzae* en milieu LB.

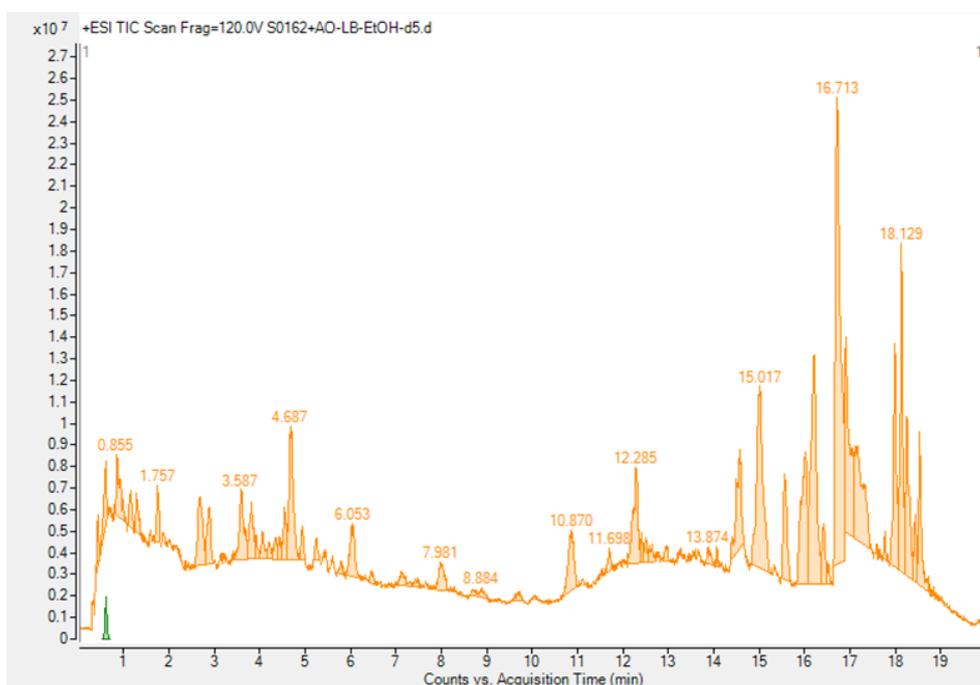


Figure B-6 : Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la co-culture de *Streptomyces* sp. + *Aspergillus oryzae* en milieu LB.

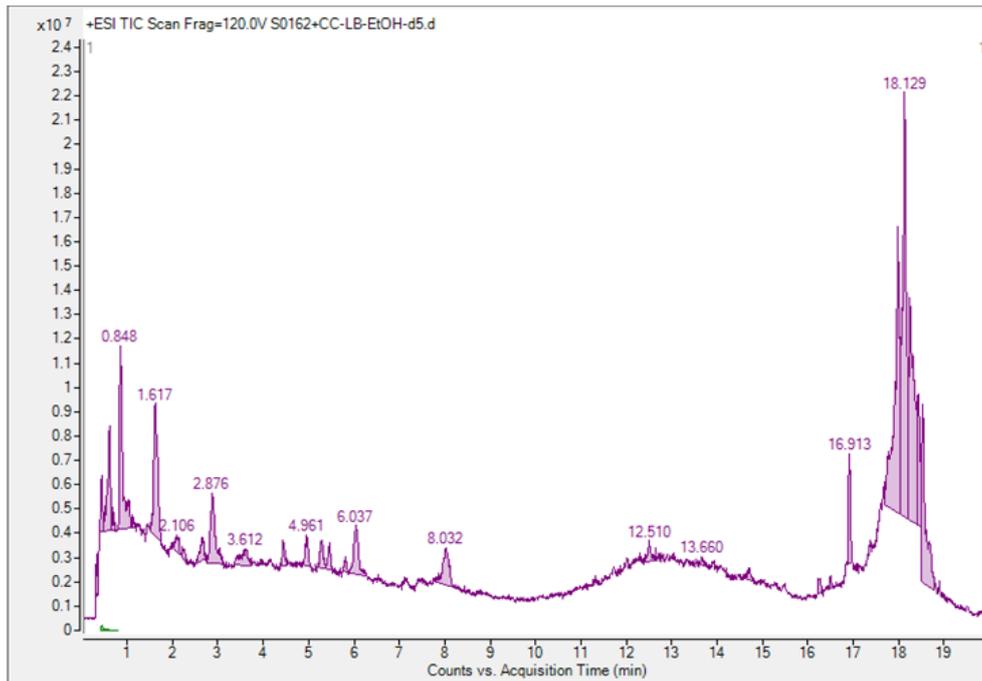


Figure B-7 : Chromatogramme (LC-MS Q-TOF) du surnageant de la co-culture de *Streptomyces* sp. + *Cladosporium cladosporioides* en milieu LB.

Title: Conception of cocktails from bacteria-fungi co-cultures for new biofungicides

Keywords: Biocontrol, Microbiology, Co-cultures, Screening, Antifungal, Metabolomics

Abstract:

The genus *Fusarium* causes plant pathologies affecting a wide variety of targets with consequences on yields and consumer health. Among them, *F. graminearum* and *F. oxysporum* have the most important economic impacts and sustainable control methods against these pathogens are currently limited. Biocontrol is an alternative to synthetic pesticides. However, it is difficult to fully exploit the potential that exists in nature. One way to discover new molecules of interest is co-culture. Involving two or more populations of cells, it recreates interactions that do not exist in monocultures. The aim of this thesis project was to bring together bacteria and fungi with known activities, and thus to discover associations producing cocktails of antifungal molecules to fight against phytopathogens.

The project started with the rational selection of microorganisms with antifungal activity reported in the literature: five bacteria (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Dietzia* sp., *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces* sp.) and five fungi (*Pseudozyma aphidis*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, and *F. oxysporum*) were chosen. Subsequently, culture conditions (medium, temperature) adequate to perform co-cultures and allow the growth of both partners involved were defined and three media were chosen: two rich media (LB, NB) and one minimal medium (GMM).

After this selection, tests in a microbioreactor (BioLector) were carried out: these involved the ten selected microorganisms in monocultures and twenty-five co-cultures in the three media conditions. A screening of the antifungal activity of the generated culture supernatants was performed against an environmental strain of *F. oxysporum* and *S. cerevisiae*. Thirteen out of twenty-five co-cultures showed activity against at least one of the two targets. After these tests, the selection of co-cultures of interest was reduced from twenty-five to ten. These co-cultures were grown in 50 mL volumes in LB and NB media that showed the best activity under the chosen conditions, and their supernatants tested for antifungal activity. These tests allowed to refine the choice and to focus on six couples: *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, *P. syringae* + *F. oxysporum*, *P. syringae* + *P. aphidis*, *Dietzia* sp. + *T. harzianum*, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. These six couples were subjected to a series of cultures and their supernatants tested on agar plates and in liquid media (against *F. oxysporum*). Three co-cultures showed a more pronounced activity, especially against *F. oxysporum* and stood out from the monocultures: *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* and *P. syringae* + *A. oryzae*. The *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* co-culture showed synergistic activity in inhibiting or slowing the growth of *F. oxysporum* compared to monocultures alone, while *P. syringae* + *A. oryzae* and *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* showed additive activity against *F. oxysporum*.

For the three selected couples, the molecules produced and secreted were studied by proteomics and metabolomics. Whatever the co-culture considered, it induces the activation of genes that remained silent in monoculture. Thus, we can observe the expression of a very high proportion of proteins or secondary metabolites (38 to 50%) exclusively present in the supernatants of co-cultures. Moreover, among the molecules secreted de novo in the co-cultures, some known for their antimicrobial or even antifungal activities could be identified for the three couples that were studied.

Titre : Conception de cocktails issus de co-cultures de bactéries et de champignons pour de nouveaux biofongicides

Mots clés : Biocontrôle, Microbiologie, Co-cultures, Criblage, Antifongique, Métabolomique

Résumé :

Le genre *Fusarium* est à l'origine de pathologies végétales concernant une grande variété de cibles avec des conséquences sur les rendements et la santé des consommateurs. Parmi elles, *F. graminearum* et *F. oxysporum* ont le plus d'impact économique et les moyens de lutte durables contre ces pathogènes sont actuellement limités. Le biocontrôle est une solution alternative aux pesticides de synthèse. Cependant, il est difficile d'exploiter pleinement le potentiel existant dans la nature. Un moyen de découvrir de nouvelles molécules d'intérêt est la co-culture. Impliquant deux ou plusieurs populations de cellules, elle recrée des interactions non existantes en monocultures. Ce projet de thèse, a ainsi eu pour but de mettre en présence des bactéries et des champignons possédant des activités connues, et ainsi de découvrir des associations produisant des cocktails de molécules antifongiques afin de lutter contre des phytopathogènes. Le projet a débuté par la sélection rationnelle de microorganismes ayant une activité antifongique rapportée dans la littérature : cinq bactéries (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Dietzia* sp., *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces* sp.) et cinq champignons (*Pseudozyma aphidis*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides* et *F. oxysporum*) ont été retenus. Par la suite, des conditions de culture (milieu, température) adéquates pour réaliser des co-cultures et permettre la croissance des deux partenaires impliqués ont été définies et trois milieux ont été choisis : deux milieux riches (LB, NB) et un milieu minimum (GMM).

Après cette sélection, des essais dans un microbioréacteur (BioLector) ont été réalisés : ces derniers impliquaient les dix microorganismes sélectionnés en monocultures et vingt-cinq co-cultures dans les trois conditions de milieu. Un criblage de l'activité antifongique des surnageants de culture générés a été réalisé contre une souche de *F. oxysporum* issue de l'environnement et *S. cerevisiae*. Treize co-cultures sur vingt-cinq ont montré une activité contre au moins l'une des deux cibles. Après ces tests, la sélection de couples d'intérêt a été réduite de vingt-cinq à dix. Ces couples ont été cultivés dans des volumes de 50 mL dans les milieux LB et NB qui ont montré la meilleure activité dans les conditions choisies, et leurs surnageants testés pour leur activité antifongique. Ces tests ont permis d'affiner le choix et de se focaliser sur six couples : *P. syringae* + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, *P. syringae* + *F. oxysporum*, *P. syringae* + *P. aphidis*, *Dietzia* sp. + *T. harzianum*, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides*. Ces six couples ont fait l'objet d'une série de cultures et de tests de surnageants sur boîte et en liquide (contre *F. oxysporum*). Trois couples ont présenté une activité plus prononcée, en particulier contre *F. oxysporum* et se sont démarqués des monocultures : *Streptomyces* sp. + *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* et *P. syringae* + *A. oryzae*. La co-culture *Streptomyces* sp. + *C. cladosporioides* a présenté une activité synergique propre à inhiber ou ralentir la croissance de *F. oxysporum* par rapport aux monocultures seules, tandis que *P. syringae* + *A. oryzae* et *Streptomyces* sp. + *A. oryzae* ont présenté une activité additive contre *F. oxysporum*.

Pour les trois couples retenus, les molécules produites et sécrétées ont été étudiées par protéomique et métabolomique. Quelle que soit la co-culture considérée, celle-ci induit l'activation de gènes restés silencieux en monoculture. On peut ainsi observer l'expression d'une très grande proportion de protéines ou de métabolites secondaires (38 à 50%) exclusivement présentes dans les surnageants de co-cultures. En outre, parmi les molécules sécrétées de novo dans les co-cultures, certaines connues pour leurs activités antimicrobiennes voire antifongiques ont pu être identifiées et ceci pour les trois couples étudiés.