



HAL
open science

**Gestion de la maladie de dépérissement du pommier :
criblage in vitro et in planta des activités protectrices
d'une collection de microorganismes contre les
Pythiacées et caractérisation chimique du principal actif
produit par l'isolat *A. westerdijkiae* A7**

Yosra Ben M'Henni

► **To cite this version:**

Yosra Ben M'Henni. Gestion de la maladie de dépérissement du pommier : criblage in vitro et in planta des activités protectrices d'une collection de microorganismes contre les Pythiacées et caractérisation chimique du principal actif produit par l'isolat *A. westerdijkiae* A7. Biologie végétale. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS127 . tel-02936517

HAL Id: tel-02936517

<https://theses.hal.science/tel-02936517v1>

Submitted on 11 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Gestion de la maladie de dépérissement du pommier :
criblage *in vitro* et *in planta* des activités protectrices
d'une collection de microorganismes contre les
Pythiacées et caractérisation chimique du principal actif
produit par l'isolat *A. westerdijkiae* A7**

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale N° 567 Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème
Spécialité de doctorat : Biologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE,
AgroParisTech, UMR BIOGER, 78850, Thiverval-
Grignon, France.
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue en
visioconférence totale, le 25/06/2020, par**

Yosra Ben M'henni

Composition du Jury

Marie DUFRESNE Professeur, Université Paris-Saclay	Présidente
Marc BARDIN Directeur de recherche, INRAE	Rapporteur
Mohamed Ali TRIKI Maître de conférences, Institut de l'Olivier, Sfax, Tunisie	Rapporteur
Franck PANABIERES Directeur de recherche, INRAE	Examineur
Sabine FILLINGER HDR, INRAE, Versailles Grignon	Directrice de thèse
Naima BOUGHALLEB M'HAMDI Professeur, Université Sousse	Co-encadrante & Examinatrice

Remerciements

Il m'est agréable d'exprimer mes remerciements les plus sincères et mes hommages à tous ceux qui m'ont aidée à la réalisation de ce travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Mme Sabine Fillinger, directrice de thèse, pour son encadrement et sa disponibilité malgré la distance et son emploi très chargé. Elle m'a soutenue dans de nombreuses difficultés que j'ai rencontrées tout au long de ce travail. Je ne la remercierai jamais assez pour son sens d'engagement, elle n'a épargné aucun effort pour me mettre sur la bonne voie et me pousser à donner le meilleur de moi-même par ses directives et ses conseils très pertinents. Qu'elle trouve ici l'expression de mon immense gratitude et ma reconnaissance.

Je tiens à remercier vivement Mme Naima Boughalleb M'hamdi, co-encadrante de thèse, pour sa confiance qu'elle m'a toujours accordé depuis plusieurs années déjà même avant ma thèse, son soutien, son enthousiasme, son aide précieuse, et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail qu'elle trouve à travers ces lignes ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mme Danièle Debieu, pour sa gentillesse et sa bienveillance, son implication, son aide si précieuse en manips ainsi que pour ses conseils scientifiques, ses remarques, ses corrections très pertinents et son esprit amical. Qu'elle trouve ici ma grande estime et mes vifs remerciements.

Je remercie également le reste de mon équipe ; Christine Auclair, Collette Audéon, mes collègues de bureau ; Jocelyne Bach, Guillaume Fouchet et Jaafar Kilani ; et en particulier mon amie Clémentine Duplaix pour les moments passés ensemble, leurs aide, leurs gentillesse et leurs positivité.

La période passée à BIOGER était surtout une expérience très riche sur tous les niveaux professionnels et humains. J'ai eu le plaisir de rencontrer des personnes formidables dont certains se sont devenus des amis dont ils se reconnaissent.

Je remercie également toutes les aides techniques de l'unité Isabelle, Martin, Christian, et Bruno pour m'avoir facilité la vie.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse. Merci à Mr Marc BARDIN et à Mr Mohamed Ali TRIKI d'avoir accepté d'être les rapporteurs et à Mme Marie

DUFRESNE et à Mr Franc PANABIERES d'avoir accepté d'être examinateurs de cette présente thèse.

Je tiens également à remercier Mr Stéphane MANN et Mr Didier BUISSON qui m'ont accueilli au laboratoire de chimie des Produits Naturels Fongiques CPNF au Museum de sciences naturelles à Paris ainsi que Mr Slim TOUNSI qui m'a accueilli au sein de son laboratoire de Biopesticides (LB) au CBS, Sfax, Tunisie.

J'ai aussi le plaisir d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Durant cette thèse, il y a eu des hauts et des bas mais tout mon sujet de thèse m'a réellement passionné. Je me suis documenté sur plusieurs volets et thématiques de recherches en biocontrôle.

J'ai appris également qu'il ne faut pas être très enthousiaste pour le déroulement d'un projet et qu'il ne faut pas crier victoire trop vite et surtout j'ai pu apprendre que rien n'est jamais perdu et qu'il y a toujours moyen d'explorer d'autres pistes de recherches. La détermination et la conviction sont la clé pour l'achèvement de n'importe quel projet.

Finalement, je dédie cette présente thèse à mes très chers parents que sans eux ce travail n'aurait pas vu le jour...je les remercie du fond du cœur pour leur soutien inlassable, leur amour et leur sacrifices infinies...Ils ont toujours cru en moi et ils m'ont toujours poussé à aller aussi loin que je pouvais. Ils m'ont aidé à progresser et à finir ma thèse dans les meilleures conditions. Qu'ils trouvent à travers ces quelques lignes ma reconnaissance et mon amour.

Je tiens également à remercier mon frère pour son soutien et son aide si précieuse, mon mari pour sa patience, ses encouragements et ses sacrifices pour que je puisse achever mon travail. Mes remerciements les plus sincères vont également à ma belle famille pour leur gentillesse et leurs mots d'encouragements qu'ils trouvent dans ces quelques lignes ma reconnaissance.

Et à Yasmin... 'Mon petit bout de chou... mon rayon de soleil ' "

J'aimerais terminer mes remerciements sur cette citation...

You never fail, until you stop trying "Albert Einstein"

Table des matières

Chapitre I Synthèse bibliographique	13
Introduction générale	14
1. Généralités sur la culture du pommier en Tunisie	16
1.1. Importance économique de la culture du pommier en Tunisie	16
1.2. Dépérissement du pommier dû aux Pythiacées	16
1.3. Symptômes de la maladie	17
1.4. Importance de la maladie en Tunisie	18
2. Présentation des Pythiacées agents du dépérissement du pommier	19
2.1. Généralités sur les Pythiacées	19
2.2. Taxonomie et cycle de vie des espèces de <i>Phytophthora</i> et de <i>Pythium</i>	19
2.2.1. Taxonomie et critères distinctifs des espèces de <i>Phytophthora</i> et de <i>Pythium</i>	19
2.2.2. Cycle de vie et critères distinctifs des espèces de <i>Phytophthora</i> et de <i>Pythium</i>	21
2.3. Importance économique des dégâts de dépérissement dus aux espèces du genre <i>Pythium</i> et <i>Phytophthora</i>	23
3. Stratégies de gestion des Pythiacées	24
3.1. Mesures prophylactiques	24
3.1.1. Gestion du sol et de l'eau	25
3.1.2. Choix des porte-greffes	25
3.2. Lutte chimique contre les oomycètes	25
3.3. Lutte biologique	27
3.3.1. Agents de biocontrôle (BCAs) contre les Pythiacées.....	28
3.3.2. Modes d'action des agents antagonistes BCAs	30
3.3.2.1. Mécanismes d'action directs des BCAs sur le pathogène	30
3.3.2.1.1. Mycoparasitisme	30
3.3.2.1.2. Antibiose.....	31
3.3.2.2. Mécanismes d'action indirects des BCAs	32

3.3.2.2.1.	Compétition nutritive et spatiale	32
3.3.2.2.2.	Induction de la réaction de résistance chez la plante	33
4.	Métabolisme secondaire	35
4.1.	Peptides non ribosomaux	36
4.1.1.	Péptaboiles	37
4.1.2.	Epipolythiodioxypiperazines	38
4.1.3.	Sidérophores	39
4.2.	Polykétides.....	39
4.3.	Terpènes et terpénoïdes	40
4.4.	Alcaloïdes	42
5.	Etude de certains genres de BCAs et leurs principaux métabolites secondaires à activité antifongique ou anti-oomycète	42
5.1.	<i>Trichoderma</i> spp	42
5.2.	<i>Aspergillus</i> spp.....	45
5.3.	<i>Bacillus</i> spp.....	45
5.3.1.	Généralités sur le genre <i>Bacillus</i>	45
5.3.2.	Métabolites secondaires à activité antifongique	46
5.3.2.1.	Lipopeptides	46
5.3.2.1.1.	Iturines	46
5.3.2.1.2.	Surfactines	47
5.3.2.1.3.	Fengycines	47
5.3.2.2.	Rôles des lipopeptides liés au biocontrôle.....	48
5.3.2.2.1.	Antagonisme	49
5.3.2.2.2.	Induction de la résistance systémique chez les plantes.....	50
5.4.	Stimulation de la croissance végétale par les BCAs ‘‘Plant-growth-promoting’’ (PGP).....	51
5.5.	Biopesticides commerciaux	54
5.5.1.	Avantages des biopesticides.....	55
5.5.2.	Inconvénients des biopesticides.....	56
5.5.3.	Développement d’un biopesticide.....	56

5.5.3.1.	Criblage de l'activité antagoniste des microorganismes.....	57
5.5.3.2.	Formulation des biopesticides.....	58
5.5.3.3.	Homologation des biopesticides	59
5.5.3.4.	Quels sont les caractéristiques requis pour faire un "bon BCA" ?.....	60
5.5.4.	Exemples de biopesticides commercialisés contre <i>Pythium</i> spp et <i>Phytophthora</i> spp	61
	Objectif de thèse.....	63
	Chapitre II	65
	Sélection <i>in vitro</i> de microorganismes contre des Pythiacées et évaluation <i>in planta</i> de leur potentiel de protection et de stimulation de la croissance végétale.....	65
	Publication 1	65
	Biocontrol and growth promotion potential of combined application of <i>Trichoderma simmonsii</i> and <i>Aspergillus westerdijkiae</i> in Apple root stock dieback	65
	Chapitre III.....	103
	Purification et caractérisation chimique de la molécule anti-Pythiacées produites par l'isolat <i>Aspergillus westerdijkiae</i> A7.....	103
	Introduction	104
	Matériel et Méthodes	106
1.	Matériel biologique et conditions de culture	106
2.	Cinétique de production de molécules à activité anti-oomycète par les cultures de BCAs fongiques	106
3.	Caractéristiques biochimiques des molécules à activité anti-oomycète du filtrat d'une culture de 7 jours de l'isolat <i>A. westerdijkiae</i> (A7)	107
3.1.	Test de thermostabilité.....	107
3.2.	Dialyse du surnageant.....	107
4.	Extraction des molécules.....	107
5.	Purification des molécules actives.....	108
6.	Evaluation de l'activité anti-oomycète de l'isolat <i>A. westerdijkiae</i> (A7).....	108
7.	Caractérisation chimique des biomolécules.....	109
7.1.	Spectroscopie de Masse couplée à la chromatographie liquide LC/MS	109
7.2.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	109

Résultats	110
1. Cinétique de production des molécules anti-oomycète des filtrats de culture des BCAs fongique <i>T. simmonsii</i> A2, <i>T. asperellum</i> A3 et <i>A. westerdijkiae</i> A7	110
2. Détermination de la nature biochimique des molécules anti-Pythiacées produites par <i>Aspergillus westerdijkiae</i> A7	112
2.1. Thermostabilité du filtrat	112
2.2. Test de Dialyse	113
3. Caractérisation chimique des molécules actives produites par la souche <i>Aspergillus westerdijkiae</i> A7	114
3.1. Extraction des métabolites anti-pythiacées	114
3.2. Purification des composés actifs du filtrat d' <i>Aspergillus westerdijkiae</i> (A7).....	115
3.3. Caractérisation chimique de la molécule active (MA) par RMN et LC/MS.....	120
Conclusion-discussion	122
Discussion générale	127
Références bibliographiques	134
Annexes	172

Liste des tableaux

Tableau 1. Sélection de <i>Phytophthora</i> spp et <i>Pythium</i> spp d'importance économique avec leurs principaux hôtes.....	24
Tableau 2. Déterminants bactériens induisant la réaction systémique par les agents de biocontrôle ...	35
Tableau 3. Caractéristiques de certains métabolites secondaires secrétés par des <i>Trichoderma</i> spp à activité anti- Pythiacées	44
Tableau 4. Caractéristiques de certains lipopeptides à rôle antifongique produits par les isolats de <i>Bacillus</i> spp et leurs phytopathogènes cibles	50
Tableau 5. Caractéristiques des exemples de BCAs fongique et bactériens et leur mode d'action PGP	54
Tableau 6. Exemples de biopesticides à base de microorganismes homologués et commercialisés à travers le monde vis-à-vis des champignons et des oomycètes (<i>Pythium</i> spp et de <i>Phytophthora</i> spp) ..	61
Tableau 7. Gradient d'élution.....	108
Tableau 8. Caractéristiques de différentes fractions collectées par HPLC à partir filtrat de culture d' <i>A. westerdijkiae</i> A7.....	116

Liste des figures

Figure 1. Des lésions typiques observées au niveau du collet du pommier dans des vergers affectés par les Pythiacées	17
Figure 2. Symptômes typiques du dépérissement sur pommier	18
Figure 3. Symptômes d'effondrement sur arbre de pommier (Symptômes typiques de dépérissement)	18
Figure 4. Cycle biologique de <i>Pythium</i> spp.....	22
Figure 5. Cycle infectieux de la pourriture des racines et du collet causé par <i>Phytophthora</i> spp.....	23
Figure 6. Schéma simplifié de la biosynthèse de peptides non ribosomiaux (NRP).....	37
Figure 7. Structure de la gliotoxine.....	39
Figure 8. Structure de l'unité de base des terpènes: l'isopentényl diphosphate (IPP)	40
Figure 9. Structure cyclique de l'iturine.....	47
Figure 10. Structure de la surfactine	47
Figure 11. Structure cyclique primaire de la Fengycine A.....	48
Figure 12. Schéma récapitulatif de l'action des principales familles des lipopeptides dans le biocontrôle des phytopathogènes.....	48
Figure 13. Mécanismes de stimulation de la croissance végétale par les PGPR	53
Figure 14. Démarche employée pour le développement d'un biopesticide depuis le criblage d'une collection d'organismes	57
Figure 15. Les premières étapes du développement d'un biopesticide	63
Figure 16. Évaluation de l'activité anti-oomycète des fractions purifiées par HPLC.....	109
Figure 17. Activité anti-Pythiacées des filtrats de culture de <i>T. simmonsii</i> (A2) et d' <i>A. westerdijkiae</i> (A7) collectés sur une période de 3 à 7 jours d'incubation à des concentrations de 10 et 25% (v/v) du filtrat sur la croissance mycélienne de <i>Pythium undulatum</i> (BME) après 72 h d'incubation à 26°C..	111
Figure 18. Activité anti-Pythiacées des filtrats de culture de de <i>T. asperellum</i> (A3) et d' <i>A. westerdijkiae</i> (A7) collectés sur une période de 3 à 7 jours d'incubation à des concentrations de 10 et 25% (v/v) sur la croissance mycélienne de <i>Phytophthora inundata</i> (BGA1) après 72 h d'incubation à 26°C..	111
Figure 19. Thermo-stabilité de l'activité anti-oomycète du filtrat de culture d' <i>Aspergillus westerdijkiae</i> A7 sur la croissance mycélienne de <i>Phytophthora inundata</i> (BGA1) après 72h d'incubation à 26°C.	113
Figure 20. Activité anti-oomycète du filtrat de culture d' <i>Aspergillus westerdijkiae</i> (A7) après dialyse sur la croissance mycélienne de <i>Phytophthora inundata</i> (BGA1) après 72 d'incubation à 26°C.....	114

Figure 21. Activité inhibitrice de la phase aqueuse et de la phase organique après extraction à l'acétate d'éthyle (1/1) du filtrat de culture d' <i>Aspergillus westerdijkiae</i> A7 vis-à-vis de <i>Phytophthora inundata</i> (BGA1) après 48h d'incubation.	115
Figure 22. Activité inhibitrice des fractions séparées par HPLC de l'extrait organique du filtrat d' <i>Aspergillus westerdijkiae</i> A7 sur la croissance mycélienne de <i>Phytophthora inundata</i> (BGA1) après 7 jours d'incubation à 26°C.	117
Figure 23. Schéma présentant les étapes successives de purification de l'extrait organique du filtrat de culture d' <i>A. westerdijkiae</i> (A7) jusqu'à l'isolement de la molécule active (MA) à activité anti-oomycète	119
Figure 24. Spectrométrie de masse LC-MS couplé à un détecteur UV-visible de la molécule active MA avec interprétation des ions observés.	121
Figure 25. Activité anti-oomycète de l'acide pénicillique sur la croissance mycélienne de <i>Phytophthora inundata</i> BGA1 après 24 h d'incubation à 28°C.	122

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIA	Acide indole 3 acétique
ANOVA	Analyse de la variance
BCA	Agent biologique de contrôle
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCM	Chromatographie sur couche mince
COV	Composés organiques volatils
Da	Dalton
dNTP	Désoxy-adénine tri-phosphate
DO	Densité Optique
e.g	Exempli gratia – Par exemple
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IPP	Isopentényl diphosphate
ISR	Induction de la résistance systémique
ITS	Internal Transcribed Spacer ou Espaceur interne transcrit
JA	Acide jasmonique
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LB	Luria-Bertani broth
LPs	Lipopetides
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRPS	non ribosomal peptide synthetase
NRP	non ribosomal peptide
OTA	Ochratoxine A
PAP	pentyl-alpha-pyrone
PCP	peptidyl carrier protein ou protéine porteuse d'acyle
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDA	Potato Dextrose Agar

PDB	Potato Dextrose broth
PH	Potentiel Hydrogène
PG	porte-greffes
PGP	Plant Growth Promoting
PGPRs	Plant-growth-promoting rhizobacteries
PK	PolyKetide
PKS	PolyKetide Synthase
PO	peroxidase
PPO	polyphenol oxidase
PS	Poids Sec
QoI	quinone outside inhibitors ou inhibiteurs externes de la quinone
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAR	réaction systémique acquise
v/v	Volume / Volume
UV	Ultraviolet

Chapitre I Synthèse bibliographique

Introduction générale

L'utilisation intensive et non raisonnée des pesticides chimiques tels que les herbicides, les insecticides et les fongicides constitue l'une des menaces majeures affectant le secteur agricole mondial. En effet, cet usage intensif a un impact néfaste sur les différentes composantes de l'écosystème, ajouté à cela les problèmes liés aux phénomènes de résistance des agents phytopathogènes aux molécules actives commercialisées fréquemment utilisées dans la gestion de ces maladies.

Durant les dernières décennies, la prise de conscience des impacts environnementaux, les conséquences des pesticides sur la santé humaine ainsi que la volonté des consommateurs d'obtenir des produits issus de productions agricoles alternatives ont entraîné un fort intérêt pour la protection biologique dans un souci de préserver l'environnement et de combattre les bioagresseurs. Les travaux de recherche s'orientent désormais vers la recherche d'alternatives impliquant de nouvelles molécules bioactives issues de microorganismes dans l'espoir de remplacer les pesticides chimiques.

Les microorganismes (bactéries, champignons) sont de remarquables agents de production de molécules bioactives. Ainsi, de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation sont utilisées pour leurs propriétés dans des domaines variés. Parmi ces molécules, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antifongiques, les bactériocines, etc. D'où l'importance de l'orientation vers la lutte biologique comme nouvelle approche de lutte ou comme composante prometteuse de la lutte intégrée. Ceci explique en partie que les bio-pesticides sont en train de prendre de plus en plus d'ampleur sur le marché des phytosanitaires et leur utilisation est plus répandue.

Ainsi, le contexte scientifique de la présente thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives à partir de microorganismes pour des leur utilisation en verger contre les Pythiacées affectant le pommier. Cette thèse a fait l'objet d'une collaboration entre (i) le laboratoire de phytopathologie à l'Institut supérieur de chott Meriem Sousse Tunisie, (ii) l'unité Mixte de Recherche BIOGER (Biologie et gestion des risques en agriculture, UMR INRA-AgroParisTech), France au sein de l'équipe de recherche Antifongiques, Mode d'action

et résistance (AMAR) et (iii) le laboratoire de chimie des Produits Naturels Fongiques CPNF au Museum de sciences naturelles à Paris.

Au cours des travaux de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité anti-oomycète d'une collection de champignons et de bactéries antagonistes.

Les résultats obtenus ainsi que leurs discussions seront présentées en deux parties:

La 1^{ère} partie portera sur l'identification moléculaire des souches fongiques et bactériennes antagonistes ainsi que l'évaluation de leurs activités anti-oomycètes *in vitro* et *in vivo*.

La 2^{ème} partie s'intéressera à la purification, à la caractérisation et à l'identification chimique du principe actif des biomolécules anti-oomycète de la souche *Aspergillus westerdijkiae* A7.

1. Généralités sur la culture du pommier en Tunisie

1.1. Importance économique de la culture du pommier en Tunisie

Le pommier appartient à l'ordre des Rosales, à la famille des Rosacées, à la sous-famille des Maloidées et au genre *Malus*. La délimitation du nombre d'espèces au sein du genre *Malus* est problématique. Selon les approches taxonomiques, il comprend entre 25 et 47 espèces, réparties dans le monde entier, principalement dans les régions tempérées (Robinson et al., 2001). En Tunisie, la culture du pommier est connue depuis longtemps essentiellement par des variétés à faible importance économique telles que Jerbi, Douce de Sfax, Gabsi, Aigre de Sfax. La pomiculture a été réellement développée dans les années 1970 par l'introduction des variétés Euro-Américaines: Golden Delicious, Red Delicious et Starkrimson (Rahmeni, 2007). La production de ce secteur en Tunisie a augmenté durant les dernières décennies ; elle est passée de 41.800 tonnes en 1990 à 122.834 tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2019).

Les principaux gouvernorats de production sont : Kasserine, Bizerte et Ben Arous (Anonyme1, 2019) avec une prédominance de production dans la région de Kasserine située au centre ouest de la Tunisie avec 70,000 tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2019).

1.2. Dépérissement du pommier dû aux Pythiacées

Le dépérissement du pommier résulte de l'attaque de l'écorce, du collet et du tronc par les *Pythiacées*. La zone infectée montre une dépression au niveau de l'écorce avec l'apparition d'une crevasse située à la limite des tissus infectés. Les Pythiacées renferment les trois genres *Phytophthora*, *Pythium* et *Phytopythium* qui constituent les agents pathogènes causant le dépérissement du pommier et présentant un facteur limitant le rendement et la productivité de cette culture en Tunisie (Souli, 2008).

Selon la zone infestée par les *Pythiacées*, on distingue 3 formes d'affections :

- Pourriture du collet : l'agent pathogène se développe sur le tronc du greffon issu du point de greffe jusqu'aux charpentières (Figure 1).
- Pourriture de l'écorce du porte-greffe : La contamination se situe entre le bourrelet de greffe et le départ des grosses racines (Lemoine et Gaudin, 1991). Ce type de pourriture commence au niveau du sol pour progresser dans les deux sens. Il ne dépasse pas le point de greffe du côté ascendant tandis qu'il peut aller jusqu'au 20 cm du côté des racines. Ce type de dépérissement est le plus fréquent chez le pommier (Souli, 2008).

- Pourriture des racines : Les pourritures sont dispersées en divers points du système racinaire (Bolay, 1992a).



Figure 1. Des lésions tyiques observées au niveau du collet du pommier dans des vergers affectés par les Pythiacées (Souli et *al.*, 2014)

1.3. Symptômes de la maladie

Les symptômes sont caractérisés généralement par un affaiblissement des arbres, le jaunissement ou la chlorose des feuilles et l'effondrement éventuel ou la mort de l'arbre (Figures 2 et 3). Dans les vergers des pommiers infestés par les Pythiacées, les premiers symptômes apparaissent au printemps sur la partie apicale sous forme d'un dessèchement des jeunes pousses terminales. Le dessèchement progresse d'une façon descendante sur une ou plusieurs branches de l'arbre. À la fin de l'été, la base des jeunes pousses de l'année se dénude. Les fruits restent petits, se colorent et mûrissent prématurément (Souli, 2008). Les arbres infectés peuvent s'affaiblir lentement durant plusieurs années, ou s'effondrer et mourir rapidement après la reprise de la croissance au printemps.

Les feuilles des arbres infestés sont de taille inférieure à la normale ; elles sont enroulées et montrent une modification au niveau de la couleur ; elles sont de couleur jaune rougeâtre en été, rougeâtre ou pourpre en automne et jaune claire au printemps (Souli, 2008). Les symptômes les plus caractéristiques s'observent à la base du tronc, de part et d'autre du bourrelet de greffe. En soulevant l'écorce, le liber est fortement nécrosé, de couleur brune à rouge et il y a dégagement d'une odeur âcre désagréable.



Figure 2. Symptômes typiques du dépérissement sur pommier (Souli et *al.*, 2014)



Figure 3. Symptômes d'effondrement sur arbre de pommier (Symptômes typiques de dépérissement) (Souli et *al.*, 2014)

1.4. Importance de la maladie en Tunisie

La maladie de dépérissement du pommier est répandue essentiellement dans les régions de Kasserine, Bizerte, Jendouba, Béja et Ben Arous. Il s'est avéré que le pourcentage le plus important d'infestation a été signalé dans le gouvernorat de Jandouba (Ghar Dimaou avec un pourcentage de l'ordre 73% et Oued Mliz avec un pourcentage de l'ordre de 67%). Les régions où l'infestation est importante se caractérisent par une dominance de sols argileux et un climat humide qui représentent des conditions favorables pour le développement des *Pythiacées* (Souli et *al.*, 2010).

Plusieurs espèces de *Pythium* et de *Phytophthora* ont été identifiées étant responsables de dépérissement du pommier dans les régions de production durant les années 2006-2008 dont *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora inundata*, *Pythium* sp., *Pythium indigoferae*, *Pythium irregulare*, *Pythium rostratifingens*, *Pythium sterilum*, *Pythium undulatum* et *Phytopythium* spp. (Souli et al., 2014). Dans la région de Kasserine *Phytophthora cactorum* est l'agent principal du dépérissement du pommier (Boughalleb et al., 2006).

2. Présentation des Pythiacées agents du dépérissement du pommier

2.1. Généralités sur les Pythiacées

Les genres *Phytophthora*, *Pythium* et *Phytopythium* appartiennent à la classe des oomycètes, qui sont des microorganismes eucaryotes, proches des diatomées et des algues brunes (McCarthy et Fitzpatrick, 2017). Les oomycètes appartiennent au super groupe des Straménopiles Alvéolites et Rhizaria (SAR) et à la division de Straménopiles (Burki, 2014 ; Meng et al., 2014 ; Kamoun et al., 2015). Ce sont des pseudo-champignons ; morphologiquement similaires aux champignons filamenteux. Toutefois, plusieurs caractéristiques structurales et métaboliques les différencient. En effet, ces pseudo-champignons sont des organismes diploïdes, avec des hyphes siphonnés, auxotrophes au stérol, et dont la paroi se compose essentiellement de 1,3- β -glucanes, 1,6- β -glucanes et 1,4- β -glucanes (Meng et al., 2014) et de chitine en plus faible proportion (Werner et al., 2002), à l'opposé des champignons, qui peuvent avoir une phase asexuée haploïde avec des hyphes septés et une paroi cellulaire composée principalement de chitine. Ces différences entre les oomycètes et les champignons peuvent expliquer l'inefficacité des fongicides ciblant respectivement la chitine et la synthèse des stérols contre les oomycètes (Meng et al., 2014).

2.2. Taxonomie et cycle de vie des espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*

2.2.1. Taxonomie et critères distinctifs des espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*

Avant l'ère de la taxonomie moléculaire, les espèces de *Pythium* ont été classées en se basant sur des caractéristiques morphologiques. Middleton (1943), Waterhouse (1967) et Plaats-Niterink (1981) ont fourni des études de la taxonomie des espèces de *Pythium* selon les caractéristiques morphologiques telles que la forme des sporanges, l'oogone (ornementations, taille et origine), la forme et le nombre d'oospores ainsi que le mode d'attachement de l'oogone à l'anthéridie. Récemment, Bouket et al (2015) ont généré une base de données d'identification de 90 espèces selon des critères morphologiques.

Historiquement, les genres *Phytophthora* et *Pythium* ont été classés dans le même ordre des *Pythiales*. Cependant, des analyses phylogénétiques des séquences du 18S rDNA et du gène Cox2 ont montré une affiliation des espèces du genre *Phytophthora* les classant dans l'ordre des Péronosporales (Beakes et Sekimoto, 2009 ; Thines et Kamoun, 2010). Jusqu'à ce jour, la taxonomie de ces genres reste controversée avec l'apparition de nouvelles espèces puis en raison des variations phénotypiques et interspécifiques (Hon, 2018).

Du point de vue morphologique, les espèces des genres *Phytophthora* et de *Pythium* présentent de nombreuses similitudes ; elles possèdent un mycélium coénocyttaire, hyalin à ramification libre. Cependant, elles présentent certaines différences caractéristiques: les hyphes de *Phytophthora* sont généralement de diamètre plus larges (5-7 μm) avec une croissance lente et une ramification à angle droit, alors que celles de *Pythium* sont plus étroites (diamètre de 4-6 μm) et se caractérisent par une croissance plus rapide. Les deux genres se différencient également au niveau des zoospores. Pour les espèces de *Phytophthora*, les zoospores se différencient à l'intérieur du sporange, à maturité, ils se libèrent dans une vésicule située à l'apex sporangial. Chez le genre *Pythium*, le protoplaste du sporange est généralement transféré à travers un tube vers une vésicule mince à l'extérieur du sporange où les zoospores sont différenciées et libérées à la rupture de ce vésicule (Hon, 2018).

Les clefs de Waterhouse utilisées à ce jour à travers le monde sont basées sur les caractéristiques morphologiques. La clef de 1963 du genre *Phytophthora* a été basée sur les caractéristiques du sporocyste, plus particulièrement sur le type de papilles, la proéminence et l'épaississement apical. Trois groupes ont été distingués selon ces derniers critères :

1. Les sporocystes réellement papillés avec un épaississement apical hémisphérique et protubérant pourvus d'une étroite ouverture.
2. Les sporocystes avec un épaississement apical moins protubérant et une étroite ouverture.
3. Les sporocystes sans papille avec un très fin épaississement apical et une large ouverture.

Chacun de ces trois groupes est subdivisé selon la position de l'anthéridie sur l'oogone, parogyne ou amphigyne pour former six groupes (I, II, III, IV, V et VI). De même, les espèces du genre *Pythium* sont classées, selon les clés de Plaats (1981) et Mugnier et Grosjean (1995), en tenant compte de la forme des sporanges. En effet, cette dernière peut être filamenteuse, filamenteuse légèrement gonflée, filamenteuse gonflée conférant ainsi au sporange une forme de dendroïde ou sphérique. La distinction des sporanges filamenteux du reste de mycélium est difficile, à moins que la formation de la vésicule indique l'emplacement du sporange. De même, la classification des espèces a été aussi basée sur la prolifération de

leurs sporanges. D'autres critères ont été utilisés pour distinguer les différentes espèces, telles que l'hétérothallisme et l'absence d'oogones. Les espèces qui ne forment pas des oogones ni en culture pure, ni par complémentarité ont été divisées en cinq groupes:

Groupe F : Il regroupe les espèces qui ont des sporanges filamenteux non gonflés

Groupe T : Ce groupe renferme les espèces qui ont des sporanges filamenteux légèrement gonflés et des sporanges filamenteux fortement gonflés.

Groupe G : Ce groupe englobe les espèces ayant des sporanges globuleux sans prolifération.

Groupe P : Il contient les espèces à sporanges proliférants.

Groupe HS : Les espèces de ce groupe forment seulement de mycélium coralloïde.

L'identification d'une espèce sur la base de critères morphologiques est très délicate et il était nécessaire de déterminer de nouveaux critères de caractérisation pour clarifier la taxonomie du genre et simplifier l'identification des espèces. L'analyse des séquences nucléotidiques de l'espace interne transcrit (ITS) de l'opéron ribosomique a permis d'établir une nouvelle classification, notamment moléculaire

2.2.2. Cycle de vie et critères distinctifs des espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*

Les principales étapes de cycle de vie de la plupart des espèces de *Pythium* et de *Phytophthora* sont similaires (Van West et al., 2003). Leurs cycles se composent d'une phase végétative et d'une phase sexuée comme illustré dans la figure 4. La phase végétative produit des sporanges et des zoospores qui permettent la survie et la dissémination de la maladie dans le sol ainsi que les chlamydospores qui sont des formes de résistance lorsque les conditions de développement des *Pythiacées* deviennent défavorables (Hardham, 2007 ; Meng et al., 2014). Les facteurs environnementaux comme la lumière et la température sont déterminants dans le choix du mode de germination des formes différenciées.

Le mycélium donne naissance à des sporanges qui peuvent germer directement pour former des hyphes capables de pénétrer dans les racines, ou bien indirectement par la production de zoospores qui sont attirées par les exsudats racinaires (Meng et al., 2014). Une fois que les zoospores libérées atteignent les organes de la plante hôte (graines, racines, tiges ou feuille), elles s'enkystent, se fixent aux racines, germent et pénètrent la surface d'organes cibles par l'intermédiaire de l'appressorium (Figure 5) (Van West et al., 2003). La rapidité du cycle permet à la phase asexuée de se répéter plusieurs fois pendant la croissance de la plante. La phase sexuée est caractérisée par la gamétogénèse conduisant à la formation des oospores

qui sont des formes de résistance de l'agent pathogène capables de survivre plusieurs années (plus de 10 ans) dans le sol en présence de la plante hôte (Van West et *al.*, 2003).

Lorsque les conditions deviennent favorables (Sol humide), les oospores germent pour donner lieu aux sporanges renfermant des zoospores qui utilisent leurs flagelles pour atteindre les tissus des végétaux susceptibles d'être infectés. Ces zoospores peuvent être transportées par l'eau de ruissellement sur de longues distances (Van West et *al.*, 2003). Plus les périodes de saturation du sol sont longues, plus le risque d'infection est important (Ellis, 1997).

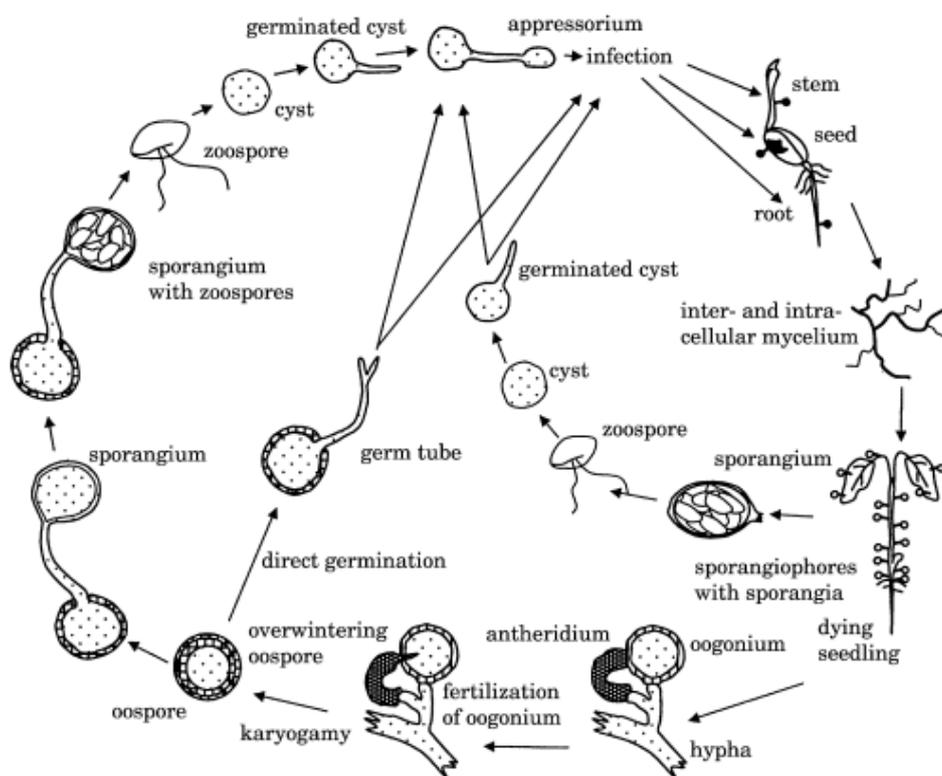


Figure 4. Cycle biologique de *Pythium* spp (Van West et *al.*, 2003)

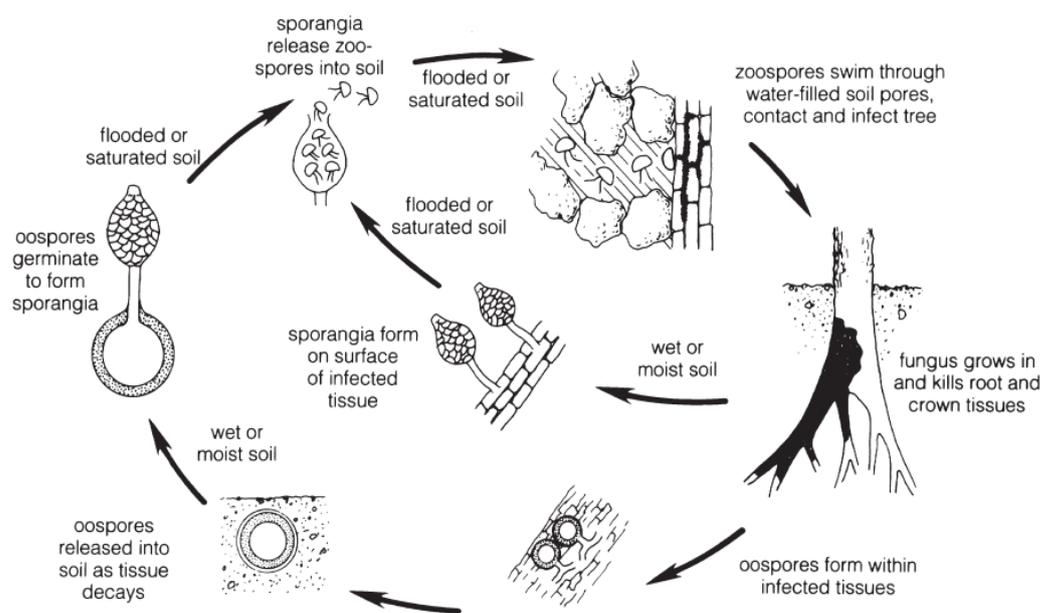


Figure 5. Cycle infectieux de la pourriture des racines et du collet causé par *Phytophthora* spp (Ellis, 1997)

2.3. Importance économique des dégâts de dépérissement dus aux espèces du genre *Pythium* et *Phytophthora*

Le genre *Phytophthora* contient les phytopathogènes les plus actifs, dont la majorité est polyphage (Meng et al., 2014). Parmi les dix oomycètes les plus virulents cinq appartiennent au genre *Phytophthora* (Kamoun et al., 2015). Les espèces appartenant à ce genre causent d'importants dégâts en particulier aux dicotylédones tels que les arbustes, les arbres fruitiers et les herbacées causant des pourritures au niveau des racines et des tiges ainsi que des tâches ou des brûlures au niveau des feuilles (Hon, 2018).

Les espèces du genre *Pythium* sont largement répandues dans le monde avec des habitats très différents. La plupart des *Pythium* spp (> 140 espèces répertoriées) sont de redoutables agents phytopathogènes polyphages spécialement sur les monocotylédones attaquant différents organes de la plante à différents stades du développement (Martin et al., 2012 ; Hon, 2018). Ils peuvent infecter les graines et les plantules causant la maladie de la fonte des semis. Ils peuvent également s'attaquer aux racines des jeunes plants ou aux plantes adultes provoquant des lésions nécrotiques au niveau de l'apex racinaire (Martin et Loper, 1999) (Tableau 1).

Tableau 1. Sélection de *Phytophthora* spp et *Pythium* spp d'importance économique avec leurs principaux hôtes

Espèce pathogène	Maladie (plantes hôtes)	Références
<i>Phytophthora infestans</i>	Mildiou (pomme de terre)	Bradeen et al. (2008)
<i>Phytophthora citrophthora</i>	Pourriture racinaire (citrus, pistachier, pêcher et quelques plantes ornementales).	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora cactorum</i>	Chancres au niveau des feuilles (pommier, poirier et fraisier)	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora cambivora</i>	Pathogène des châtaigniers d'Europe et d'arbustes ornementaux	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora nicotianae/parasitica</i>	Plantes hôtes : tabac, coton, oignon et quelques espèces ornementales ; cultures tropicales tels que le cocotier et l'ananas	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora megakarya</i>	Cacaotier	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora drechsleri</i>	Plusieurs plantes ornementales	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora ramorum</i>	Dépérissement de plusieurs cultures (mélèzes, rhododendrons, chênes, châtaigniers, hêtres et sapins)	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora palmivora</i>	Pourriture des fruits, pourriture racinaire, chancres (cocotier, papaye, orchidées et palmiers)	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora cinnamoni</i>	Dépérissement de plantes ornementales ligneuses (Eucalyptus) Pourriture racinaire (avocatier et ananas)	Erwin et Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora nicotianae var. parasitica</i>	<i>Mildiou terrestre sur piment</i>	<i>Boughalleb et El Mahjoub (2005)</i>
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Pourritures racinaires (Solanacées)	Stirling et al. (2016)
<i>Pythium ultimum</i>	Fontes des semis et pourriture racinaire, chancre du collet et de la tige (maïs, soja, pomme de terre, blé et des cultures ornementales)	Stirling et al. (2016)
<i>Pythium myriotilum</i>	Pourritures racinaires de cultures sous serre tels le haricot, la betterave et le gingembre	Stirling et al. (2016)
<i>Pythium irregulare</i>	Pourritures racinaires de nombreuses cultures en serre e.g. tomate et concombre	Stirling et al. (2016)

3. Stratégies de gestion des Pythiacées

Les maladies des cultures causées par les *Pythiacées* sont particulièrement difficiles à maîtriser nécessitant une gestion intégrée comprenant plusieurs moyens de lutte préventive et curative (techniques prophylactiques, lutte chimique et biologique).

3.1. Mesures prophylactiques

Les mesures prophylactiques demeurent le moyen de lutte le plus efficace contre les oomycètes. Elles consistent essentiellement à instaurer les conditions défavorables à l'apparition et à la dissémination de ces agents phytopathogènes afin de limiter le recours aux pesticides.

Le choix du site de la plantation des cultures est primordial dans la protection des cultures ainsi que le choix des variétés des plantes de porte-greffes (sains et résistants), la gestion de l'eau et du sol (la gestion de l'irrigation et la désinfection du sol) ainsi que les techniques culturales (tels que la rotation des cultures) (Pscheidt, 2015; Chaudhary et *al.*, 2016).

3.1.1. Gestion du sol et de l'eau

Le sol des terres agricoles doit être sain et suffisamment drainant pour éviter la stagnation de l'eau favorisant sa contamination. En effet, les Pythiacées affectent essentiellement les sols lourds et humides (Pscheidt, 2015).

Le contrôle du drainage superficiel du sol reste le moyen le plus efficace pour éviter le développement de ces phytopathogènes. Si le sol est lourd, le dépistage des symptômes d'infestation sous terrain est très important pour détecter la maladie afin de mieux la gérer par la suite. Après une forte pluie, il faut éviter la stagnation de l'eau dans les baissières ou entre les rangs en installant des canaux d'évacuation vers les fossés pour éviter la transmission de la maladie à d'autres plantes (Pscheidt, 2015).

La technique de plantation en buttes est un moyen préventif efficace pour gérer ce problème. Cette technique agit à deux niveaux sur le développement des Pythiacées ; elle permet un réchauffement plus rapide du sol et améliore le drainage, diminuant ainsi le risque d'infection par les zoospores (Neuweiler et Heller, 1998). La couverture des buttes par un film de plastique noir permet d'accentuer l'effet bénéfique de la plantation sur buttes ainsi que l'amendement avec du compost. Le compost va enrichir le sol avec les champignons et bactéries antagonistes et contribue à la réduction des populations des pathogènes (Pscheidt, 2019). L'emploi d'un programme de fertilisation comprenant des matières organiques libérant l'ammoniac, l'acide nitrique et des engrais à base de soufre défavorise le développement des Pythiacées (*Phytophthora et Pythium*) (Pscheidt, 2015).

3.1.2. Choix des porte-greffes

Le choix du porte greffe est essentiel dans la gestion de la protection des cultures. La sensibilité des porte-greffes varie selon les espèces de *Phytophthora* et de *Pythium* (Boughalleb et *al.*, 2006b; Souli, 2011; Babadoost, 2015).

3.2. Lutte chimique contre les oomycètes

La lutte chimique contre les oomycètes est utilisée de façon curative en cas de développement de la maladie à l'intérieur des tissus de la plante mais elle peut aussi être appliquée en lutte préventive.

Les fongicides utilisés contre les oomycètes sont classés en trois groupes : les phénylamides, les phosphonates et les « quinone outside inhibitors » (QoI) (Hirooka et Ishii, 2013; Pscheidt, 2015). Parmi ces produits chimiques certains sont diffusés dans le xylème (des racines vers les pousses) et d'autres dans l'ensemble du système vasculaire (xylème et phloème).

En lutte préventive, l'application des produits se fait de préférence au printemps avant la croissance végétative des plantes par incorporation dans le sol. Les anti-oomycètes peuvent être utilisés curativement ; soit pour traiter les semences en cas de fonte de semis ou pour traiter les racines (pourriture racinaire) par incorporation du produit dans le sol ou par pulvérisation au niveau des feuilles en cas de maladies foliaires.

Les produits appartenant au groupe des phénylamides sont des fongicides systémiques dont les substances actives sont le métalaxyl, l'oxadixyl et le méfénoxam (metalaxyl-M) (Hu et *al.*, 2008). Ils sont diffusés seulement dans le xylème et agissent en inhibant la croissance mycélienne et la formation des sporanges (Pscheidt, 2015). Ils sont utilisés pour le contrôle des maladies de fonte des semis et des pourritures des racines et du collet causées par les espèces de *Phytophthora* et de *Pythium* mais peuvent également être appliqués au niveau des feuilles pour traiter les maladies causées par les pathogènes foliaires (Pscheidt, 2015).

Le groupe des phosphonates tels que le fosetyl-Al et l'acide phosphorique diffusent dans les deux sens, ascendant et descendant, à l'intérieur de la plante. Ces produits sont absorbés par les racines, tiges et feuilles et transportés dans les différents tissus. Le contrôle des maladies est plus efficace en cas d'application foliaire des produits par rapport à un traitement du sol en raison de la dégradation rapide de ces produits par les microorganismes du sol (Hirooka et Ishii, 2013; Pscheidt, 2015).

Le mode d'action des produits est différent. Ils peuvent soit agir directement en inhibant le développement de l'oomycète, soit indirectement en stimulant les défenses de la plante et par induction de la résistance. Les deux groupes phosphonates et phénylamides ne tuent pas l'oomycète mais peuvent empêcher son développement ou ralentir sa croissance à l'intérieur des tissus et ainsi retarder l'apparition des symptômes en cas d'infection de la plante. En cas de dégradation du produit, l'oomycète peut reprendre sa croissance à l'intérieur des tissus de la plante (Pscheidt, 2015).

Les QoI sont des fongicides systémiques qui agissent contre plusieurs champignons et oomycètes, dont les espèces des genres *Phytophthora* et *Pythium*. Ils sont utilisés pour traiter spécifiquement les maladies foliaires. La diffusion de ce type de fongicide se fait à l'intérieur des tissus des feuilles et des tiges (Hirooka et Ishii, 2013; Pscheidt, 2015).

Les produits de contrôle des oomycètes à base de Fosetyl-Al tel que le produit commercialisé sous le nom "Aliette" et à base de (metalaxyl-M +mancozeb) commercialisé sous le nom de ridomil se sont montrés efficaces dans le contrôle de plusieurs maladies de pourriture racinaire causées par les *Phytophthora* spp tels que *Ph. fragariae* et contre *Ph. cactorum* et *Ph. citrophthora* en culture agricole (Thomidis et Tsipouridis, 2001 ; Turkolmez et Dervis, 2017).

Plusieurs études ont montré l'efficacité de métalaxyl (groupe des phénylamides) dans la lutte contre les oomycètes tels que *Py. myriotylum*, *Py. Sylvaticum*, *Py. heterothallicum*, *Ph. fragariae*, *Ph. infestans* (Mazzola et al., 2002; Fontem et al., 2005), et pour le traitement des semences contre les maladies de fonte de semis (Hwang et al. 2001).

L'une des stratégies qui s'est montrée la plus efficace est l'application du Métalaxyl et Fosétyl-Al mais cette efficacité a été remise en cause dès l'apparition du phénomène de résistance chez plusieurs espèces de *Phytophthora* au Métalaxyl, tels que chez *P. nicotianae* en horticulture ornementale (Hwang et Benson, 2005 ; Saville et al, 2015). D'autres phénomènes de résistance des espèces de *Phytophthora* aux produits chimiques ont été reportés tels que la résistance d'isolats de *Ph. parasitica* résistants au méfénoxam à partir de pépinières de la Virginie (USA) ainsi que des isolats de *Ph. capsici* (Parra et Ristaino, 2001, Hu et al., 2008; Dunn et al., 2010; Larousse et Galiana, 2017).

L'inefficacité du contrôle par les produits chimiques commercialisés due aux phénomènes de résistance des oomycètes ainsi que le danger potentiel des molécules chimiques pour la santé humaine et pour l'environnement ont augmenté l'intérêt pour développer des solutions alternatives permettant de contrôler ces phytopathogènes (Gullino et Kuijpers, 1994 ; Larousse et Galiana, 2017). Ces dernières années, de nombreuses recherches à l'échelle internationale se sont orientées vers la lutte biologique afin d'identifier des solutions alternatives aux pesticides.

3.3. Lutte biologique

Le biocontrôle est un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels. Seules ou associées à d'autres moyens de protection des plantes, ces techniques sont fondées sur les mécanismes et les interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel. Ainsi, le principe du biocontrôle repose sur la gestion des équilibres des populations des agresseurs plutôt que sur leur éradication.

Les produits de biocontrôle sont définis dans 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. Ils comprennent en particulier les macro-organismes (acariens, insectes et nématodes...) utilisés pour protéger les plantes des bio-agresseurs et les produits phytopharmaceutiques composés de micro-organismes, de médiateurs chimiques tels que les phéromones et les kairomones, ou de substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale.

Les produits de biocontrôle sont des produits phytopharmaceutiques autorisés à l'issue d'une évaluation complète des risques pour la santé humaine, la santé animale et l'environnement et conforme aux exigences européennes.

D'une façon générale, le contrôle biologique concerne l'utilisation des produits naturels extraits ou fermentés de diverses sources tels que les microorganismes antagonistes introduits ou résidents capables de réduire les populations pathogènes des plantes et d'inhiber les différents processus biologiques du pathogène.

L'organisme ayant le pouvoir antagoniste vis-à-vis d'un pathogène donné est appelé l'agent de lutte biologique (BCA) (Pal et McSpadden Gardener, 2006).

Dans les paragraphes suivants, quelques exemples d'agents de lutte biologique ayant montré une activité antagoniste vis-à-vis de *Pythium* et de *Phytophthora* seront présentés.

3.3.1. Agents de biocontrôle (BCAs) contre les Pythiacées

Parmi les BCAs ayant des activités contre des espèces phytopathogènes notamment contre les *Pythium* et *Phytophthora* spp., les genres *Gliocladium* et *Trichoderma* sont les plus étudiées (Pankhurst et Lynch, 2005).

L'espèce *G. catenulatum* s'est montrée efficace contre *Phytophthora cactorum* et *Phytophthora fragariae* protégeant les cultures de fraisiers *Fragaria ananassa* (Vestberg et al., 2004). D'autres recherches ont montré son rôle inhibiteur vis-à-vis de *Pythium ultimum* (Mcquilken et al., 2001).

Les espèces du genre *Trichoderma* sont largement utilisées dans le biocontrôle de différents phytopathogènes grâce à leurs caractéristiques biologiques : leur grande aptitude de reproduction et de croissance, le mycoparasitisme et la production de métabolites secondaires (Chaverri et al., 2015; Degenkolb et al., 2015; Waghunde et al., 2016).

Parmi ces espèces, *T. viride*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, et *T. harzianum* sont d'importants producteurs d'antibiotiques et d'enzymes (Schuster et Schmoll, 2010; Contreras Cornejo et al., 2016).

Des espèces de *T. harzianum* sont des inhibiteurs de la croissance mycélienne de *Phytophthora capsici* et de *Phytophthora erythroseptica* affectant les racines du *Capsicum*

ainsi que *Phytophthora nicotianae* et de *Pythium ultimum* affectant les racines de citrus (Sid Ahmed et al., 1999; Benfradj et al., 2016).

T. harzianum T39 et *T. virens* DAR 74290 ont aussi une activité de biocontrôle contre *Phytophthora erythroseptica* affectant les tomates et les pommes de terre (Etebarian et al., 2000).

Des isolats de *T. harzianum* et de *T. viride* se sont montrées efficaces contre *Ph. cactorum* affectant le pommier (Roiger et Jeffers, 1991; Smith et al., 1990; Larkin et Fravel, 1998; Warlop, 2002). D'autres études ont mentionné le pouvoir inhibiteur de *T. harzianum* vis-à-vis de *Ph. cactorum*, *Ph. parasitica*, *Ph. citrophthora* et de *Pythium* spp. (Papavizas et Lewis, 1989 ; Smith et al., 1990 ; Roiger et Jeffers, 1991 ; Lederer et al., 1992 ; Singh et Islam, 2010).

Des isolats de *T. asperellum* (ICC012, T11 et TV1) ainsi que *T. gamsii* ICC080 sont efficaces en inhibant la croissance mycélienne des *Pythium* spp. et des *Phytophthora* spp (Bonaterra et al., 2012 ; Woo et al., 2014).

Les espèces du genre *Aspergillus* sont également connues par leur effet inhibiteur sur plusieurs champignons et oomycètes (Getha et al., 2005; Gachomo et Kotchoni, 2008). Il existe des souches non toxiques d'*A. flavus* largement utilisées en lutte biologique telle que la souche AF36 qui est très efficace vis-à-vis d'*A. flavus* toxique sur plusieurs plantes (sorgho, blé, maïs...) (Reddy et al., 2010; Al-Othman et al., 2013). Certaines espèces telles que *A. repens*, *A. niger* et *A. fumigatus* sont inhibiteurs vis-à-vis de *Ph. palmivora* infestant le cacaoyer au Nigeria (Adebola et Amadi, 2010).

Les isolats du genre *Penicillium* sont connus pour leurs activités antifongiques contre plusieurs maladies telluriques. En effet, Ma et al. (2008) ont rapporté le potentiel de *Penicillium striatisporum* en tant que BCA vis-à-vis de plusieurs maladies causées par des phytopathogènes telles que les *Phytophthora* spp.

Parmi les agents de biocontrôle bactériens, les genres *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* sont les plus importants (Pankhurst et Lynch, 2005).

Plusieurs études ont montré le rôle inhibiteur des espèces de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance mycélienne de *Pythium aphanidermatum* et de *Phytophthora capsici* (Muthukumar et al., 2011, Shen et al., 2002).

Les espèces du genre *Bacillus* sont les plus étudiées grâce à leur importante production de substances antifongiques et antibactériennes permettant l'inhibition de plusieurs espèces phytopathogènes (Yoshida et al., 2001; Nollet et Rathore, 2015).

Parmi ces espèces, on trouve les espèces *B. subtilis* et *B. amyloliquefasciens* qui sont responsables de l'inhibition de la croissance mycélienne de plusieurs espèces de *Phytophthora* (Caldeira et al., 2006; Chen et al., 2009; Tan et al., 2013).

La plupart des BCAs ont une action antagoniste vis-à-vis de plusieurs pathogènes (spectre large) mais certains ont une action spécifique vis-à-vis d'un pathogène donné (spectre réduit ; Maurhofer et al., 1994, Van Dijk et Nelson, 2000, Mavrodi et al., 2012, Sang et al., 2013).

3.3.2. Modes d'action des agents antagonistes BCAs

Les BCAs peuvent agir soit directement sur l'agent pathogène (parasitisme ; par antibiose, et sécrétion d'enzymes), ou bien indirectement (par compétition et stimulation des réactions de défense de la plante vis-à-vis de l'agent pathogène) ou en utilisant les deux modes d'action directe et indirecte. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jikli, 2003).

Les différents modes d'actions ne sont pas exclusifs les uns des autres. Une même espèce antagoniste peut en posséder plusieurs. Ces différents modes d'action peuvent agir indépendamment, successivement ou simultanément (Pal et McSpadden Gardener, 2006; Nega, 2014). La détermination des modes d'action des BCAs est primordiale pour réussir le développement d'une stratégie de contrôle efficace contre les phytopathogènes (Verma et al., 2007).

Certains BCAs peuvent aussi contrôler le développement des maladies causées par les oomycètes par l'induction de la réaction de la résistance ISR chez les plantes hôtes par l'intermédiaire des composés volatiles ou non volatiles (Benhamou et al., 2002, Sang et Kim, 2012).

3.3.2.1. Mécanismes d'action directs des BCAs sur le pathogène

3.3.2.1.1. Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme est une relation trophique qu'établit un microorganisme au détriment d'un champignon ou d'un oomycète. Le processus d'intervention des BCAs par mycoparasitisme est très complexe ; il se déroule en plusieurs étapes successives qui sont généralement très spécifiques et varient selon l'espèce de pathogène (Narayanasamy, 2013). Les étapes de ce processus sont les suivantes : (1) Chimiotropisme et reconnaissance, (2) pénétration (3) enroulement autour de la paroi cellulaire, (4) lyse de la paroi (Pankhurst et Lynch, 2005).

Le mycoparasitisme fait intervenir plusieurs interactions chimiques telles que la production des lectines dans les premières étapes de chimiotropisme et la reconnaissance entre le mycoparasite (BCA) et le pathogène (Pankhurst et Lynch, 2005). La pénétration repose sur la production d'enzymes lytiques telles que les chitinases et la β -glucanase par les BCAs pour hydrolyser la chitine et la β -1,3- glucane qui sont les principaux constituants de la paroi de la plupart des champignons et des oomycètes (Narayanasamy, 2013). L'altération de parois conduit à la lyse des cellules inhibant ainsi le développement du pathogène. Ce mécanisme d'action est fréquemment utilisé par les champignons, tels que *Gliocladium* spp. et *Trichoderma* spp. (Carsolio et al., 1999; Georgakopoulos et al., 2002; Punja et Utkhede, 2003).

Les espèces du genre *Trichoderma* sont les plus étudiées grâce à leurs propriétés mycoparasitiques largement rapportées (Narayanasamy, 2013; Rhouma et al., 2018; Boughalleb-M'Hamdi et al., 2018). On peut notamment citer, l'espèce de *Trichoderma virens* qui est considérée comme mycoparasite agressif vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes fongiques (Narayanasamy, 2013). D'autres espèces telles que *T. asperellum* et *T. spirale* ont un pouvoir mycoparasitaire inhibant complètement la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* (Lorito et al., 1993). D'autres études ont montré le rôle des β -1,6-Glucanases produits par *Trichoderma* spp. dans l'inhibition du *Phytophthora citrophthora* (Druzhinina et al., 2011).

3.3.2.1.2. Antibiose

L'antibiose est le mécanisme d'antagonisme le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jacobsen, 2006). Il se caractérise par la sécrétion de métabolites à faibles concentrations ciblant le pathogène. Ces molécules peuvent être plus ou moins spécifiques, des composés volatiles, des antifongiques, des antibactériens ou d'autres substances toxiques ayant un effet antagoniste direct sur les organismes cibles (Narayanasamy, 2013 ; Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014 ; Pankhurst et Lynch, 2015). Ces métabolites possèdent généralement un large spectre d'action contre plusieurs phytopathogènes (Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014). De nombreux champignons et bactéries sont producteurs de ces composés toxiques.

Pour les BCAs bactériens, les espèces de *Bacillus subtilis*, de *Serratia plymuthica* et de *Pseudomonas fluorescens* sont les plus connues pour leur production de divers métabolites impliqués dans la suppression de plusieurs phytopathogènes telluriques (Raaijmakers et al., 2002; Duffy et al., 2003) ; parmi ces métabolites, la phénazine, le phloroglucinal 2,4- diacétyl

et la pyrrolnitrine produites par l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (Narayanasamy, 2013; Vacheron et al., 2016; Haas et Keel, 2003).

Les espèces du genre *Bacillus* sont caractéristiques pour la production des lipopeptides (fengycines, surfactines, iturines et bacillomycines) inhibiteurs de la croissance de divers phytopathogènes (Nollet et Rathore, 2015).

Concernant les BCAs fongiques, les espèces du genre *Trichoderma* sont les plus étudiées grâce à leur production importante de métabolites secondaires bioactifs de natures diverses. Exerçant un effet inhibiteur ils interviennent dans la suppression de plusieurs pathogènes telluriques (Rhouma et al., 2018; Boughalleb-M'Hamdi et al., 2018; Vinale et al., 2007-2014). Parmi ces métabolites, les polyketides, les alcaloïdes, les terpénoïdes, et les peptaïboles dont les plus importants sont la 6-pentyl-alpha-pyrone (6PAP), les viridines et gliovirines, les glisoprenines et gliotoxines. Ils sont toxiques à des concentrations qui dépendent du composé et de la cible (McMullin et al., 2017 ; Raaijmakers et al., 2009 ; Benitez et al., 2004).

Les métabolites sécrétés et agissant *via* l'antibiose opérant à plusieurs niveaux : altération ou inhibition de la germination, de la croissance et/ou de la sporulation du pathogène, distorsion des hyphes du pathogène, modification de l'aspect des colonies et production de formes spécifiques comme les pseudo-parenchymes ou encore en inhibant leur développement (Montesinos et al., 2009 ; Pankhurst et Lynch, 2005).

Plusieurs métabolites et enzymes lytiques produits par les BCAs sont responsables de l'antagonisme vis-à-vis des oomycètes (Lee et al., 2003, Lee et al., 2008, Timmusk et al., 2009, Muthukumar et al., 2011).

3.3.2.2. Mécanismes d'action indirects des BCAs

3.3.2.2.1. Compétition nutritive et spatiale

D'un point de vue microbien, les sols des plantes sont des environnements où les nutriments sont limités, ce qui entraîne la compétition entre les microorganismes (Pankhurst et Lynch, 2005). Les BCAs ont la capacité de se développer rapidement, de coloniser les sites d'infection des plantes et par conséquent de limiter le développement des pathogènes (Lorito et al., 1994 ; Pankhurst et Lynch, 2005). Cette activité permet de limiter l'incidence et la sévérité des maladies, en particulier celles causées par les phytopathogènes telluriques tels que des *Pythium* spp et de *Phytophthora* spp (Narayanasamy, 2013).

La compétition entre les microorganismes pour le carbone, le nitrogène et d'autres nutriments dans la rhizosphère peut être un mécanisme de contrôle indirecte des pathogènes. Certains microorganismes bactériens tels que les *Pseudomonas* spp. sont capables de chélater les sources de fer sous la forme d'ions ferriques (Fe^{3+}) dans la rhizosphère en produisant des sidérophores, réduisant ainsi la disponibilité du fer pour l'agent pathogène essentiel pour son développement (Whipps, 2001).

Les *Trichoderma* spp. sont aussi connus par leur capacité à séquestrer les ions ferriques par l'intermédiaire de sidérophores (Verma et al., 2007). Des études menées par Segarra et al (2010) ont montré le rôle important des sidérophores produits par *T. asperellum* dans l'antagonisme contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Parmi les espèces du genre *Aspergillus*, *A. flavus* non toxique s'est montré efficace en tant que BCA vis-à-vis d'*A. flavus* affectant la culture du coton. Cet effet antagoniste est dû à son pouvoir de compétition nutritif et spatiale important (Ehrlich, 2014).

3.3.2.2.2. Induction de la réaction de résistance chez la plante

L'induction de la résistance chez la plante hôte est parmi les mécanismes les plus exploités en lutte biologique contre les pathogènes des plantes. Elle peut être locale ou systémique selon la nature et la source d'éliciteurs (abiotiques ou biotiques) (Klopper et al., 2004). Elle peut être induite par une variété de micro-organismes non pathogènes, les saprobes et les rhizobactéries tels que *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloquelaciens* et *Bacillus thuringiensis* (Klopper et al., 2004 ; Elad et Stewart, 2007).

Les réactions de défense chez la plante hôte par l'effet antagoniste de certains BCA induisent la synthèse de différents composés par la plante. Ces composés agissent directement sur le développement de l'agent pathogène ou forment des barrières réduisant ainsi l'infection (Pal McSpadden et Gardener, 2006).

Des études faites sur plusieurs espèces appartenant au genre *Trichoderma* mettent en relation leur pouvoir colonisateur des racines des plantes et leur important pouvoir de stimulation de la défense chez les plantes hôtes. Cette interaction entre le BCA et la plante induit l'accumulation des peroxydases, des chitinases, glucanases, des phenylalanines et des hydroperoxydes lyases, activant ainsi les voies de synthèse des réactions de défense et induisant l'accumulation des phytoalexines (Howell et al., 2000; Yedidia et al., 2003; Harman et al., 2004a; Narayanasamy, 2013).

La voie de synthèse des réactions de la résistance chez l'hôte comprend en premier lieu l'expression de la réaction systémique acquise "SAR" qui est un mécanisme de défense produit par la plante suite à l'infection par un pathogène. La réaction SAR conduit généralement à l'expression de protéines (PR) liées à la pathogénie, y compris une variété d'enzymes tels que les chitinases et β -1,3-glucanases (Durrant et Dong, 2004). Elle est associée à une augmentation de la concentration d'acide salicylique (AS) à la fois localement au niveau du site d'infection, mais aussi de manière systémique dans les tissus distants de la plante.

En second lieu, l'induction de la résistance systémique "ISR" est déclenchée. Elle est caractérisée par la production d'acide jasmonique (AJ) et/ ou d'éthylène (ET) (Van Loon et Bakker, 2005 ; Rettinassababady et Jeyalakshmi, 2014). L'implication de l'AS dans l'ISR a été démontrée aussi dans certaines interactions plantes-pathogènes-rhizobactéries (Van Loon et Bakker, 2005). L'expression du phénomène de l'ISR comme pour le cas de SAR se déroule en trois étapes suivantes:

1. Perception par la plante des molécules actives produites par PGPR ou élicitation du phénomène
2. Transmission d'un signal systémique dans la plante
3. Expression du ou des mécanisme(s) de défense *sensu stricto* induits permettant d'inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte (Ongena et Thonart, 2006)

Plusieurs déterminants bactériens de l'ISR ont été caractérisés, ils sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2. Déterminants bactériens induisant la réaction systémique par les agents de biocontrôle

Espèce bactérienne	Plante hôte	Déterminant bactériens	Type	Reference
<i>Bacillus mycoides</i>	Betterave	Peroxydase, chitinase et β -1,3-glucanase	ISR	Bargabus et al. (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> GB03 et IN937a	Arabidopsis	2,3-butanediol	ISR	Ryu et al. (2004)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
CHA0	Arabidopsis	Antibiotiques (DAPG)	ISR	Iavicoli et al. (2003)
WCS374	Radis	Lipopolysaccharide	ISR	Leeman et al. (1995)
		Siderophore		Leeman et al. (1995)
		Iron regulated factor		Leeman et al. (1995)
WCS417	Œillet	Lipopolysaccharide	ISR	Van Peer et Schipper (1992)
	Radis	Lipopolysaccharide	ISR	Leeman et al. (1995)
		Iron regulated factor		Leeman et al. (1995)
	Arabidopsis	Lipopolysaccharide	ISR	Van Wees et al. (1997)
	Tomate	Lipopolysaccharide	ISR	Duijff et al. (1997)
<i>Pseudomonas putida</i>	Arabidopsis	Lipopolysaccharide	ISR	Meziane et al. (2005)
WCS 358		Siderophore	ISR	Meziane et al. (2005)
BTP1	Haricot	Z,3-hexenal	ISR	Ongena et al. (2004)
<i>Serratia marcescens</i> 90-166	Concombre	Siderophore	ISR	Press et al. (2001)

Source (Pal McSpadden et Gardener, 2006).

4. Métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire est défini comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de molécules à faible poids moléculaire, non essentielles mais pouvant procurer un avantage sélectif dans certaines conditions. Il est généralement opposé au métabolisme primaire qui regroupe l'ensemble des voies cataboliques et anaboliques indispensables à la survie et à la reproduction de la cellule. Les métabolites secondaires interviennent dans la signalisation, le développement et l'interaction avec d'autres microorganismes ; ils peuvent être toxiques pour d'autres organismes y compris les champignons et les oomycètes phytopathogènes (Keller et al., 2005; Osbourn, 2010).

La recherche de métabolites secondaires a été particulièrement importante dans le domaine pharmaceutique. Elle a commencé par la découverte de la pénicilline chez le champignon *Penicillium notatum* en 1928 par Fleming, suivie par la découverte de la streptomycine isolée à partir de *Streptomyces griseus* en 1944 par Waksman. Ces découvertes ont annoncé l'âge d'or de l'exploitation de plusieurs organismes et la découverte d'antibiotiques (revue par

Woodruff, 2014). Les métabolites secondaires possèdent des structures chimiques diverses avec des activités biologiques variées (antifongiques, antibiotiques, antivirales, antitumorale, etc...) (Demain, 2014). L'activité biologique de ces métabolites est souvent spécifique d'une espèce donnée (Binder, 2007).

Plusieurs microorganismes produisent des métabolites secondaires. Parmi les bactéries, les genres *Actinomycètes*, *Streptomyces*, *Bacillus* et *Pseudomonas*... Quant aux champignons filamenteux les espèces du genres *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* constituent d'excellents modèles pour la recherche de nouveaux métabolites secondaires (Binder, 2007 ; Sanchez et al., 2012).

Les métabolites secondaires peuvent être classées en cinq familles principales : les peptides non ribosomiques, les polykétides, les alcaloïdes, les terpènes et terpénoïdes. Chaque famille présente des caractéristiques structurales particulières issues de leur voie de biosynthèse. Ces composés sont synthétisés par des complexes enzymatiques, codés en général par des groupes de gènes (Speckbacher et Zeilinger, 2018).

4.1. Peptides non ribosomaux

Les peptides non ribosomaux (non ribosomal peptide : NRP) constituent l'une des principales familles de métabolites secondaires. Ces molécules sont synthétisées par des complexes enzymatiques multifonctionnels appelés synthétases de peptides non ribosomaux (non ribosomal peptide synthetase : NRPS) qui assemblent différents composés à partir d'une vaste gamme de précurseurs (Mukherjee et al., 2011). Il existe plusieurs type de NRPS : les linéaires (type A), les itératives (type B) et les non linéaires (type C) (Mootz et al., 2002).

Les NRPS peuvent être constituées d'un ou plusieurs modules qui ont pour rôle l'incorporation d'un acide aminé dans la chaîne d'assemblage du peptide. Chacun de ces modules est subdivisé en domaines. Tous les modules comprennent obligatoirement le domaine d'adénylation (A), le domaine porteur de peptide (peptidyl carrier protein : PCP) et le domaine de condensation (C), à l'exception du module d'initiation qui lui ne contient pas de domaine C (Figure 6). Il existe d'autres domaines facultatifs qui peuvent apporter des modifications au peptide en cours de synthèse comme des domaines d'épimérisation (permettent la conversion de L-acide aminé en D-acide aminé ou des domaines de N-méthylation qui rajoute un groupement méthyl sur l'azote des domaines ou des domaines de réduction qui vont réduire différents groupements (carboxyle ou alcool) (Von Döhren, 2004). Ces domaines facultatifs modifient la chaîne peptidique au cours de l'élongation et

elles sont responsables de la diversification structurale au sein de cette catégorie de métabolites.

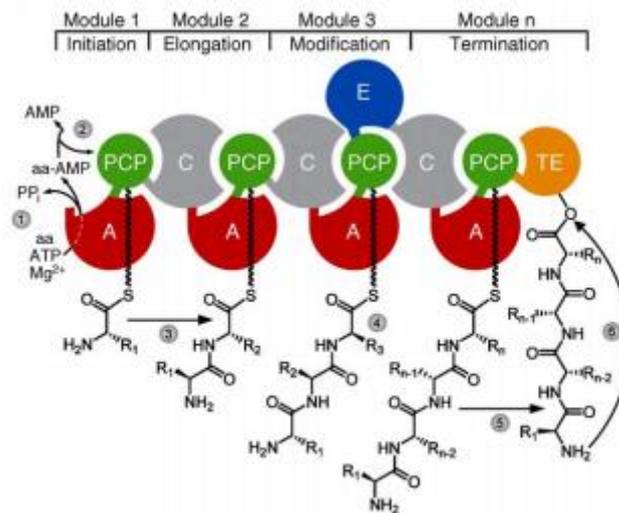


Figure 6. Schéma simplifié de la biosynthèse de peptides non ribosomaux (NRP ; Strieker et *al.*, 2010)

Ces complexes enzymatiques utilisent des acides aminés protéinogènes et non protéinogènes pour synthétiser les NRP (Keller et *al.*, 2005). Les acides aminés non protéinogènes sont souvent responsables de l'activité biologique de ces métabolites (Walsh et Fischbach, 2010).

Les NRP peuvent avoir plusieurs fonctions. Parmi les NRP on trouve la gliotoxine qui est un cyclodipeptide sécrété par *Trichoderma viride* ayant une fonction immunosupresseur. L'acide dimérumique, un cyclodipeptide produit par *Trichoderma virens* et *Penicillium chrysogenum* et la ferricrocine, un 6-cyclopeptide produit par *Aspergillus nidulans* interviennent en tant que sidérophores. La trichorzine TVB, 18-Acylpeptide sécrétés par *Trichoderma virens* a des activités antifongiques (Von Döhren, 2004).

Les principaux métabolites synthétisés par les NRPSs peuvent être classés en péptaboiles, épipolythiodioxypiperazines et sidérophores (Speckbacher et Zeilinger, 2018).

4.1.1. Péptaboiles

Les péptaboiles sont des peptides, dont la plupart sont linéaires, rarement cycliques avec une taille de 0,5 à 2,1 kDa et composés de 4 à 21 résidus (Neumann et *al.*, 2015). La caractéristique majeure de ces métabolites est l'inclusion de l'acide aminé non protéinogénique acide aminobutyrique, souvent en nombre élevé (Neumann et *al.*, 2015 ;

Speckbacher et Zeilinger, 2018). En se basant sur leurs séquences et structures, ils peuvent être divisés en péptaboiles, lipopéptaboiles, lipoaminopéptaboiles, péptaboiles cycliques et d'autres petites molécules (Speckbacher et Zeilinger, 2018).

Les premières péptaboiles décrits sont les suzukancillines et alaméthicines découverts en 1960 (Ooka et *al.*, 1966). Les métabolites péptaboiloïques sont produites par plusieurs genres fongiques : *Trichoderma*, *Emericellopsis* et *Gliocladium* (Vey et *al.*, 2001 ; Wiest et *al.*, 2002 ; Mukherjee et *al.*, 2011). Ils sont spécialement décrits pour les champignons filamenteux présentant un mode de vie mycoparasitique. 80% des péptaboiles connus proviennent du genre *Trichoderma* telles que les trichorzianines, les harzianines, les trichozines, les trichokindines (*Trichoderma harzianum*) et les trichotoxines (*T. viride*) (Degenkolb et *al.*, 2008; Leclerc et *al.*, 1998; Neumann et *al.*, 2015).

Plusieurs études suggèrent une implication majeure des péptaboiles dans l'activité antifongique en générale et dans les interactions mycoparasitiques en particulier, pouvant agir en synergie avec des enzymes hydrolytiques pour favoriser le mycoparasitisme des champignons phytopathogènes (Lorito et *al.*, 1996). Parmi les péptaboiles ayant cette activité ceux produits par *Clonostachys rosea* vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum* ou par *Sepedonium tulasneanum* vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et de *Phytophthora infestans* ainsi que les trichokonines produits par *Trichoderma pseudokongii* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* (Rodríguez et *al.*, 2011 ; Otto et *al.*, 2016).

D'autres études ont montré la dominance des péptaboiles dans les formulations de produits commercialisés à base de cinq espèces du complexe *Trichoderma harzianum* (Degenkolb et *al.*, 2015). Les métabolites péptaboiloïques interviennent aussi dans l'induction de la réaction ISR de la plante en régulant la synthèse de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique (Viterbo et *al.*, 2007).

4.1.2. Epipolythiodioxypiperazines

Les epipolythiodioxypiperazines (ETPs) sont des toxines dérivées des dikétopiperazines (DKPs) avec des structures plus rares. La principale caractéristique des ETP est la présence de ponts di ou polysulfures (Guo et *al.*, 2013). Ces structures rares confèrent à ces molécules leurs toxicités. La toxicité de ces molécules se présentent au moins de deux façons, en reliant les protéines vitales par liaison S-cystéines ou par le cycle redox formant des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui peuvent causer des dommages au pathogène. Parmi les molécules les plus connus appartenant à cette classe est la gliotoxine (Figure 7) qui a été

isolée à partir de *Aspergillus fumigatus* et qui est produite par plusieurs isolats de *T. virens* Q (Guo et al., 2013 ; Zeilinger et al., 2016).

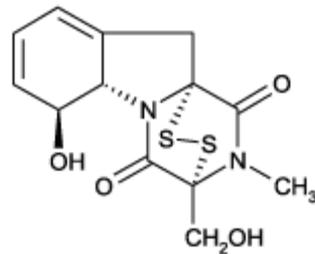


Figure 7. Structure de la gliotoxine

4.1.3. Sidérophores

Les sidérophores sont des chélateurs sécrétés par les microorganismes pour capter le fer lorsqu'ils sont dans un environnement pauvre en fer, cet oligo élément nécessaire à leur survie (Haas, 2003). Ils jouent un rôle important dans le biocontrôle contre les phytopathogènes par le biais de la compétition. Les sidérophores les plus connus sont les pyoverdines produites par différentes espèces du genre *Pseudomonas* (Budzikiewicz, 2004). Ils interviennent également dans la stimulation de la croissance végétale par la réduction du stress oxydatif. Ainsi, des études menées par Segarra et al., (2010) ont montré le rôle des sidérophores produits par *Trichoderma asperellum* T34 dans le contrôle de *Fusarium oxysporum* avec une réduction de l'infestation de la tomate et une stimulation de la croissance végétale des racines des plantes. D'autres études ont montré le rôle des sidérophores produits par *Trichoderma hamatum* GD12 vis-à-vis de *S. sclerotiorum* et leurs rôles dans la stimulation de la croissance végétale de la laitue (Shaw et al., 2016).

Les sidérophores produits par le BCA bactérien HS124 a également montré une activité antifongique importante vis-à-vis de *Phytophthora capsaci* infestant le piment (Hyun et al., 2014).

4.2. Polykétides

Les polykétides constituent une grande classe de métabolites secondaires avec des structures diverses et des activités biologiques multiples y compris des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitiques et antitumorales (Gaitatzis et al., 2002; Shen, 2003). Le large spectre de leurs activités les rend parmi les plus recherchés des métabolites secondaires sur les plans économiques, industriels et cliniques (Shen, 2003). Les

exemples les plus connus des polykétides sont : l'érythromycine A, l'immunosuppresseur FK506, les ochratoxines, l'acide pénicillique et la rapamycine. Ils sont synthétisés par des complexes enzymatiques, les polykétides synthases (PKS) dont il existe différents types chez les champignons. Les PKS de type I peuvent fonctionner de façon modulaire alors que les PKS de type III peuvent fonctionner de façon itérative (Gensheimer et Mushegian, 2004). Les polykétides sont synthétisés par une succession d'étapes de condensation de groupes acétyle ou malonyle.

La classification des polykétides se fait selon leurs structures chimiques, plus particulièrement, selon le nombre d'unités acétates qui les composent, en tri-, tétra-, penta-, hexa- et hépta-kétides. Quelques exemples typiques sont, le 6-méthyl acide salicylique (tétrakétide) de *P. patulum*, la melleine (pentakétide) d'*A. ochraceus* et d'*A. melleus*, et l'acide mycophénolique (heptacétide) de *P. brevicompactum* (Fujii et al., 2001).

4.3. Terpènes et terpénoïdes

Cette famille de métabolites comprend des molécules avec des structures très diverses, des molécules simples avec des structures linéaires et d'autres plus complexes avec des structures cycliques. Les terpènes sont des hydrocarbures synthétisés à partir d'unités d'isoprène diphosphate (Figure 8) composées de cinq carbones: l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP).

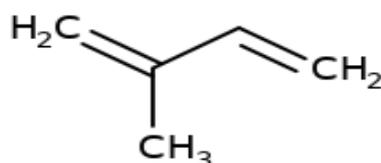


Figure 8. Structure de l'unité de base des terpènes: l'isopentényl diphosphate (IPP)

La synthèse des terpènes est issue de la voie des mévalonates, à partir de deux unités d'acétyl Coenzyme A (acetyl-CoA) (Keller et al., 2005; Christianson, 2008). La diversité des terpènes s'explique par l'intervention de cyclases permettant d'obtenir une grande variété de composés mono ou pluricycliques.

On distingue les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10) les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterterpènes (C25), les triterpènes (C30) et les tétraterpènes (C40). Des chaînes plus longues peuvent être obtenues par la dimérisation de chaînes de 15 ou 20 carbones.

La biosynthèse des terpènes est réalisée en deux étapes : la première étape permet la synthèse des précurseurs par les prényltransferases, la seconde consiste en la cyclisation des précurseurs par des terpènes cyclases. Les prényltransferases fusionnent les différentes unités d'isoprènes pour obtenir les précurseurs directs de la synthèse des terpènes. Il existe 3 prényltransferases : les géranyl diphosphatases synthétisent les géranyl diphosphates (GPP, molécules à 10 carbones), précurseurs des monoterpènes. Les farnésyl diphosphatases fabriquent des farnésyl diphosphates (FPP, molécules à 15 carbones), précurseurs des sesquiterpènes. Enfin, les géranylgéranyl diphosphatases réalisent des géranylgéranyl diphosphates (GGPP, molécules à 20 carbones), les précurseurs des diterpènes. Les GGPP et les FPP peuvent ensuite être couplés pour former des molécules plus conséquentes à 30 ou 40 carbones respectivement (Christianson, 2008; Wawrzyn et *al.*, 2012). Ces précurseurs sont ensuite cyclisés par des terpènes cyclases, également appelées terpène synthases. Le terpène ainsi obtenu peut, par la suite, être modifié par d'autres enzymes: méthylation, carboxylation, ou encore hydroxylation (Wawrzyn et *al.*, 2012).

Les terpénoïdes possédant des structures analogues aux terpènes avec une structure isoprène multiple de 5 carbones. Ils possèdent des atomes d'oxygène donnant lieu à des groupements alcools ou cétones. Leur classement est similaire aux terpènes.

Plusieurs terpénoïdes connus sont produits par des champignons ; ils peuvent avoir des activités biologiques très diverses (antibiotiques, antifongiques, antitumorale, phytohormones...) (de Souza et *al.*, 2011; Speckbacher et Zeilinger, 2018). Il existe notamment les gibbérellines, des phytohormones produits par plusieurs espèces fongiques dont un isolat *Aspergillus fumigatus*, endophyte du soja qui stimulent la croissance végétale des plantes (croissance des tiges, des pousses et des fruits (Khan et *al.*, 2011).

Les trichothécènes qui sont des mycotoxines peuvent avoir plusieurs activités biologiques. Ce sont des métabolites d'intérêt agrochimique et pharmacologique. Parmi les trichothécènes à activité antifongique on trouve le trichothécène harzianum A produit par *Trichoderma arundinaceum* inhibant la croissance mycélienne de *B. cinerea* et de *R. solani* et induisent une

ISR chez la tomate (Malmierca et al., 2012). L'activité anti-oomycète des trichothecènes a été mentionnée vis-à-vis de *Phytophthora nicotianae* (Mondol et al., 2015).

4.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés cycliques caractérisés par la présence d'une fonction basique azotée généralement incluse dans un hétérocycle. Ils renferment un grand nombre de molécules très diverses du point de vue structurale et d'activité biologique (antifongiques, antivirale et antitumorale...) (Ziegler et Facchini, 2008; Xu et al., 2014). Les alcaloïdes dérivent principalement des acides aminés qui peuvent être à l'origine d'un ou plusieurs types d'hétérocycles azotés. Ils comprennent principalement les indoles-alcaloïdes qui dérivent du tryptophane et qui comprend un noyau indole (Xu et al., 2014). Ces métabolites sont largement produits par les bactéries et les champignons, en particulier des ascomycètes (Xu et al., 2014).

Les alcaloïdes peuvent être classés en 3 groupes. Les alcaloïdes vrais (alcaloïdes indoliques) sont synthétisés à partir d'acides aminés. Leur atome d'azote est inclus dans un hétérocycle. Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas dérivés d'acides aminés et leur atome d'azote est généralement inclus dans un hétérocycle. Puis, les proto-alcaloïdes sont synthétisés à partir d'acides aminés dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un cycle. L'une des voies de synthèses principales de métabolites secondaires des champignons est celle qui vise à produire des alcaloïdes vrais (Zhang et al., 2012).

Plusieurs alcaloïdes possèdent des activités anti-oomycètes telle que les deux métabolites N-(methyl-3-oxodec6-enoyl)-2-pyrroline et N-(methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline produites par *Metarhizium anisopliae* HF698 inhibent la croissance mycélienne de *P. sojae* (Uchida et al., 2005; Deshmukh et al., 2018).

5. Etude de certains genres de BCAs et leurs principaux métabolites secondaires à activité anti antifongique ou anti-oomycète

5.1. *Trichoderma* spp

Le genre *Trichoderma* appartient aux ascomycètes et à la famille des *Hypocreaceae*. Ce genre est caractérisé par la présence d'un grand nombre d'isolats considérés comme BCAs vis-à-vis de plusieurs champignons phytopathogènes (Reino et al., 2008). Plusieurs mécanismes d'action sont impliqués dans l'activité antifongique des *Trichoderma* spp telles que le mycoparasitisme, la compétition trophique ainsi que la production de composés

non-volatiles et volatiles dont font partie les enzymes lytiques et d'autres métabolites secondaires fongitoxiques (Reino et *al.*, 2008 ; Afzal et *al.*, 2013).

Les espèces de *Trichoderma* produisent plus de 180 métabolites avec des structures très diverses (plus que 100 structures différentes) (Reino et *al.*, 2008). Cette diversité varie selon les conditions environnementales, le sol, la plante et l'agent pathogène cible auxquels ils sont confrontés. Ces métabolites appartiennent à différentes classes chimiques (Reino et *al.*, 2008). Des exemples de métabolites à activité anti-oomycètes sont illustrés dans le tableau 3.

L'optimum de la production de métabolites secondaires par un isolat donné tel que *Trichoderma harzianum* dépend de l'hôte, des facteurs éliciteurs de pathogène et d'autres conditions abiotiques ainsi que la balance entre la biosynthèse et la biotransformation de métabolite. Pour maximiser l'effet inhibiteur d'un isolat donné, la compréhension et la manipulation des facteurs régulateurs de la production permettent d'améliorer le processus de production de composés naturels secrétés par ces champignons antagonistes (Vinale et *al.*, 2008).

Tableau 3. Caractéristiques de certains métabolites secondaires secrétés par des *Trichoderma* spp à activité anti-Pythiacées

Métabolites	Source	Agents pathogène cible	Références
4-methyl-6-alkyl-R-pyrones	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Pythium debaryanum</i>	Chattapadhyay et Dureja, (2006)
Azaphilone	<i>Trichoderma</i> T22	<i>Pythium ultimum</i>	Vinale et al. (2014)
Harzianopyridone	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pythium ultimum</i>	Vinale et al. (2014)
Gliotoxine	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Pythium ultimum</i>	Vargas. (2014)
Acide harzianique	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pythium irregulare</i>	Vinale et al. (2009)
Gliovirine	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Pythium</i> spp.	Chet et al. (1997) Howell. (1998)
Cerinolactone	<i>T. cerinum</i>	<i>P. utimum</i>	Vinale et al. (2012)
6-pentyl- α -pyrone (6PAP)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phy.cinnamomi</i> <i>P. middletonii</i>	Vinale et al. (2008)
Polyketides	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phy.cinnamomi</i> <i>P. middletonii</i>	Schoroekch et al. (2009)
Koninginin D	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>P.middletonii</i> <i>Phytophthora cinnamomi</i> ,	Dunbp et al. (1989)
T22 azapilone	<i>T. harzianum</i> T22	<i>P. ultimum</i>	Vinale et al. (2006)
Harzianolide (13-A) T39 butenolide (13-B) Dehydro harzianolide (13-C) T39	<i>T. harzianum</i>	<i>P. ultimum</i>	Almassi et al. (1991) Vinale et al. (2006) Claydon et al. (1991) Ordentlich et al. (1992)
Homothalline I Homothalline II	<i>T. koningi</i>	<i>Phytohthora</i> spp.	Pratt et al. (1972) Edenborough et Herbert, (1988)
Trichoianine	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Phytohthora cactorum</i>	Hajji et al. (1989)

5.2. *Aspergillus* spp.

Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme sources potentielles de métabolites secondaires d'importance médicale, mais elles sont également connues pour leur production de mycotoxines telles que l'ochratoxine ainsi que d'autres toxines (Frisvad et al., 2011; Vega et al., 2006; Mata et al., 2007; Noonim et al., 2008; Gil-Serna et al., 2009; Gil-Serna et al., 2015; Marino et al., 2009). Parmi ces toxines; l'acide penicillique, les xanthomegnines ou les melleines sont néfastes pour la santé humaine (Fredimoses et al., 2015; Mikkola et al., 2015; Chakrabortti et Liang, 2016; Frisvad et al., 2004).

Les métabolites secondaires à activité antifongique issus des *Aspergillus* spp. vis-à-vis des oomycètes sont peu étudiés. Certaines études ont montré l'effet inhibiteur de quelques espèces d'*Aspergillus* telle que celui d'*A. piperis* A/5 contre *Pythium aphanidermatum*. Cet effet inhibiteur est dû à la production d'acide gluconique, d'acide citrique et d'acide itaconique et de ses dérivés (Jovičić-Petrović et al., 2016). D'autres études ont rapporté le rôle des terremides A et B et de la lovastatine produits par *Aspergillus terreus* dans l'inhibition de la croissance mycélienne de *Pythium aphanidermatum* affectant le concombre (Ferrón et al., 2005; Wang et al., 2011).

Selvakumar et Srivastava (2000) ont étudié le rôle des métabolites synthétisés par *Aspergillus niger* AN-27 (2-carboxy-methyl-3-hexyl-maleic anhydride et 2 méthylène-3-hexyl-butanedioic acid) en tant que PGP (plant growth promoting) et de leurs effets positifs sur le développement de la biomasse racinaire et la longueur des pousses de chou-fleur. Les isolats d'*A. terreus* 65 et 9F sont capables d'inhiber la croissance mycélienne de *P. aphanidermatum* par la production de glucanases (Halo et al., 2018).

5.3. *Bacillus* spp.

5.3.1. Généralités sur le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, l'ordre de *Bacillales*, la classe des *Bacilles* et le phylum des *Firmicutes*. Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont largement distribués dans différents écosystèmes grâce à leur capacité à former des endospores résistantes aux changements de conditions (Harwood et al., 2018; Villarreal-Delgado et al., 2018).

Ils sont parmi les BCAs les plus attractifs et les mieux étudiés pour leur capacité à produire une large gamme de métabolites bioactifs ainsi que leur rôle dans la promotion de la croissance végétale (PGP) (Cavaglieri et al., 2005 ; Earl et al., 2008). Plusieurs études ont montré l'efficacité de ces espèces en tant que BCAs vis-à-vis d'un large spectre de

phytopathogènes (Jacobsen et al., 2004; McSpadden Gardener et Fravel, 2002; Pérez-García et al., 2011 ; Fravel, 2005; Shafi et al., 2017).

Les espèces du genre *Bacillus* utilisent différents modes d'action pour le biocontrôle des phytopathogènes tels que l'antagonisme par la production des métabolites antifongiques et antibactériens, la compétition spatiale et nutritive ainsi que l'induction de la résistance systémique chez l'hôte (Santoyo et al., 2012 ; Khan et al., 2012; Martínez-Hidalgo et al., 2015).

5.3.2. Métabolites secondaires à activité antifongique

Les *Bacillus* spp synthétisent une multitude de métabolites secondaires comme les antibiotiques, les métabolites antifongiques qui sont essentiellement des lipopeptides (Ongena et Jacques, 2008; Gong et al., 2015). Les plus forts producteurs de lipopeptides (LPs) sont *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* (de Souza et al., 2018; Zhao et al., 2017).

5.3.2.1. Lipopeptides

Les lipopeptides (LPs) sont des oligopeptides cycliques à faible poids moléculaire, lié à une chaîne d'acide gras et synthétisés par les NRPSs fréquemment produits par les *Bacillus* spp. (Gond et al., 2015; Han et al., 2015; Deng et al., 2017). Leur activité biologique dépend du type de l'acide aminé, de la structure de la chaîne d'acide gras (cyclisation, de la longueur et de la ramification) (Ongena et Jacques, 2008; Frikha-Gargouri et al., 2017). Ils possèdent de nombreuses propriétés parmi lesquelles des activités antibiotiques pouvant être utilisées dans la lutte biologique grâce à des mécanismes d'antagonisme direct et indirect. Les LPs sont classées en trois familles principales: iturines, surfactines et fengycines (Nihorimbere, 2010; Tapi et al., 2010; Sumi et al., 2014; Jemil et al., 2017).

5.3.2.1.1. Iturines

Les iturines sont des héptapeptides cycliques reliés par une liaison amide à une chaîne d'acide gras β -aminée composé de 14 à 17 carbones (Figure 9) (Stayanarayana, 2012).

Les iturines possèdent plusieurs propriétés qui peuvent être exploitées en industrie pharmaceutique, agroalimentaire ou agronomique. Plusieurs études ont mentionné leur forte activité antifongique contre un large spectre de champignons phytopathogènes (Ongena et Jacques, 2008 ; Yu et al., 2002). Parmi des iturines on connaît principalement les iturines A, C, les bacillomycines D, F, L et LC et la mycosubtiline.

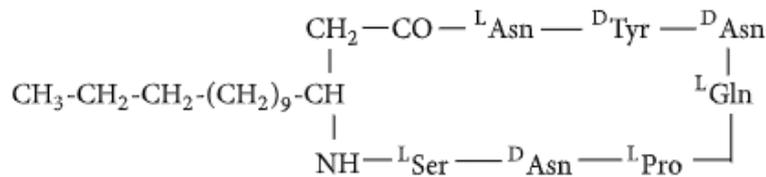


Figure 9. Structure cyclique de l'iturine (Meena et Kanwar, 2015)

5.3.2.1.2. Surfactines

La famille des surfactines est composée des heptapeptides liée à une chaîne d'acide gras d'une longueur (C12-C16) avec une liaison ester pour former une lactone cyclique (Figure 10) (Ongena et Jacques, 2008). Les surfactines présentent des activités hémolytiques, antifongiques, antivirales et/ou antibactériennes (Ongena et Jacques, 2008). Ils englobent des variantes structurelles telles que l'esperine, la lichenysine, la pumilacidine et la surfactine.

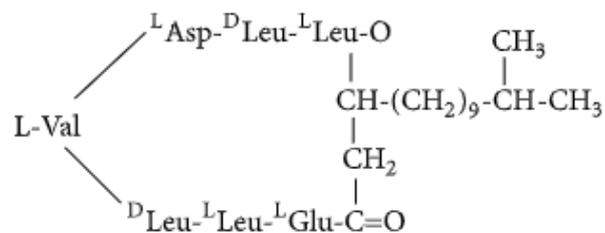


Figure 10. Structure de la surfactine (Meena et Kanwar, 2015)

5.3.2.1.3. Fengycines

Les fengycines sont des acyldécapéptides cycliques reliées à une chaîne d'acide gras β -hydroxylée de 16 à 18 carbones (Styanaryana et *al.*, 2012). Les fengycines possèdent une grande activité fongitoxique particulièrement contre les champignons filamenteux (Meena et Kanwar, 2015). Leur mode d'action est moins bien connu que ceux des autres familles de lipopeptides. Cependant, il a été rapporté qu'ils interagissent avec les couches lipidiques et peuvent altérer la structure des membranes cellulaires (Ongena et Jacques, 2008). La famille des fengycines comprend la fengycine A (Figure 11) et B ou les plipastanines (Ongena et Jacques, 2008; Meena et Kanwar, 2015).

5.3.2.2.1. Antagonisme

Les LPs produits par *Bacillus* spp peuvent être utilisées en lutte biologique. Plusieurs études ont montré l'importance des activités antifongiques des iturines et des fengycines contre plusieurs phytopathogènes affectant différentes plantes hôtes (Kim et *al.*, 2009; Kim et *al.*, 2004; Yoshida, 2001; Yu et *al.*, 2002). Des exemples d'isolat *Bacillus* et le rôle de leurs lipopeptides sont cités dans le tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques de certains lipopeptides à rôle antifongique produits par les isolats de *Bacillus* spp et leurs phytopathogènes cibles

Lipopeptides	Isolats <i>Bacillus</i>	Phytopathogènes	references
Iturine/Fengycine	<i>B. subtilis</i> M4	<i>Pythium ultimum</i>	Ongena et al. (2005)
Fengycine	<i>B. subtilis</i> M4	<i>Botrytis cinerea</i>	Ongena et al. (2005)
Iturine/Fengycine	<i>B. subtilis</i>	<i>Podospaera fusca</i>	Romero et al. (2007)
Fengycine	<i>B. subtilis</i> JA026	<i>Gibberella zeae</i>	Liu et al. (2005)
Surfactine	<i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46	<i>Xanthomonas axonopodis</i> PV. <i>Glycines</i>	Preecha et al. (2010)
Surfactine/Fengycine	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Alvarez et al. (2012)
Fengycine, Mycosubtiline, Subtuline	<i>B. subtilis</i> JA	<i>F. graminearum</i> , <i>R. solani</i> , <i>Pythium irregulare</i> <i>Cladosporium fulvum</i>	Chen et al. (2008)
Fengycine bacillomycine	<i>B. subtilis</i> SQR 9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cao et al. (2012)
<i>Bacillomycine</i> D (n-C14) <i>Bacillomycine</i> D (iso-C15)	<i>B. vallismortis</i> ZZ185	<i>F. graminearum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>R. solani</i> , <i>C. parasitica</i> et <i>P. capsici</i>	Zhao et al. (2010)
iturine A	<i>B. subtilis</i> RB14	<i>Rhizoctonia solani</i>	Asaka et al. (1996)
mycosubtiline	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Leclere et al (2005)
fengycines	<i>Bacillus subtilis</i> GA1	<i>Botrytis cinerea</i>	Touré et al.(2004)
iturine	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i> A1Z	<i>Macrophomina phasolina</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Kumar et al. (2011)
iturine D Fengycine	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i> LBM500	<i>Aspergillus spp</i> , <i>Fusarium sp.et Bipolaris Sorokiniana</i> .	Benitez et al. (2010)

5.3.2.2.2. Induction de la résistance systémique chez les plantes

L'implication des LPs dans le phénomène de l'ISR a été démontrée sur divers patho-systèmes grâce à l'utilisation de LPs purifiés ou à l'utilisation de mutants possédant des motifs antigéniques modifiés. Les surfactines pures - et les fengycines dans une moindre mesure - fournissent le même effet d'induction de l'immunité des plantes de soja que celle

établie par les cellules de la souche *B. amyloliquefaciens* (S499). Dans une approche complémentaire, la surexpression des gènes de la biosynthèse de fengycines et de surfactines par la souche *B. subtilis* 168 est associée à l'induction de l'ISR dans des plantes de tomates et de soja (Ongena et al., 2007).

Selon Chen et al. (2009), la surfactine synthétisée par *Bacillus amyloliquefaciens* permet de former un biofilm qui renforce la capacité défensive de la plante hôte en cas d'infestation par des bactéries phytopathogènes. Des études menées par Park et al (2013) ont montré l'induction de l'ISR par la stimulation de la production de l'acide salicylique suite à l'action antagoniste de *B. vallismortis* BS07 vis-à-vis de *Phytophthora capsici* et de *Colletotrichum acutatum* sur piment. D'autres études ont mentionné la stimulation de la production des PO et PPO par les plantes de tomates qui sont des facteurs d'induction de l'ISR suite à l'antagonisme de *B. subtilis* vis-à-vis d'*Alternaria solani* et de *Phytophthora infestans* (Chowdappa et al., 2013).

5.4. Stimulation de la croissance végétale par les BCAs "Plant-growth-promoting" (PGP)

Ajouté à leur rôle d'antagonistes, certains BCAs bactériens et fongiques possèdent un important potentiel de stimulation de la croissance des plantes hôtes (PGP). Les BCAs peuvent réduire l'incidence des maladies en stimulant la croissance végétale aux premiers stades d'infestation par le pathogène.

Les mécanismes qui interviennent dans la PGP sont classés en deux catégories, mécanismes directs et indirects. Le mécanisme direct comprend la fixation d'azote, la solubilisation de phosphore, la colonisation des racines (avec production d'un biofilm) ainsi que la production de phytohormones. Le mécanisme indirect comprend la production d'enzymes lytiques et l'antibiose (Ngoma et al., 2012; Shaikh et al., 2016). La production des sidérophores est également impliquée dans les deux types de mécanisme. Ils améliorent la biosynthèse de certains phytohormones telles que l'acide gibbérellique (GA3) et l'indole-3-acide acétique (IAA) (Chaube et al., 2003; Harman, 2011).

Les phytohormones (telles que les auxines) améliorent l'acquisition des nutriments en agissant sur l'expression, la division et la différenciation cellulaire de la plante et, par conséquent, stimulent la croissance des pousses et induisent les réactions de défense chez la plante (Vessey, 2003; Ghanashyam et Jain, 2009).

Parmi les BCAs les plus étudiés pour leur rôle PGP, on trouve le genre *Bacillus*. Des études ont montré l'effet PGP de *B. subtilis* OTPB1 sur la longueur et la vigueur des racines

ainsi qu'au niveau de la partie aérienne des plantes de tomates. Cette stimulation est due à une grande concentration des hormones GA3 et IAA ainsi que des enzymes liées à la défense de la plante (la peroxidase (PO), la polyphenole oxidase (PPO) et la superoxide dismutase) dans les plantes traitées comparées à celles non traitées (Chowdappa et *al.*, 2013).

Plusieurs études ont mentionné l'effet des *Trichoderma* spp en tant que PGP (Punja et Utkhede, 2003; Hermosa et *al.*, 2012). Des études menées par Woo et *al* (2006) ont montré une augmentation du poids sec racinaire des plantes de fève traitées par *T. viride*. L'effet est dû à la production des phytohormones de croissance et à une amélioration du transfert des minéraux dans la rhizosphère (Harmen et *al.*, 2004).

Les "Plant-growth-promoting rhizobacteries"(PGPRs) sont parmi les bactéries colonisatrices de la rhizosphère les plus importantes dont certaines peuvent être endophytes. Plusieurs études ont montré le potentiel de ces bactéries dans l'accumulation et l'assimilation des nutriments (N, P, K) dans le sol et au niveau des plantes (Figure 13) (Esitken et *al.*, 2010 ; Lavakush et *al.*, 2014). Les PGPRs sont classés en 4 groupes : les biofertilisants, les phytostimulants, les contrôleurs de stress et les rhizomédiateurs. Parmi les biofertilisants, on trouve les bactéries diazotrophes telles que *Pseudomonas stutzeri* A15, qui peuvent fixer l'azote atmosphérique et les transférer aux plantes sous sa forme assimilable. Plusieurs espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* solubilisent le phosphate du sol essentiel aux plantes (Drogue et *al.*, 2012). Les phytostimulateurs sont des producteurs des phytohormones telles que les auxines (AIA) qui augmentent la biomasse du système racinaire induisant une meilleure acquisition des nutriments par la plante (Lugtenberg et Kamilova, 2009; Drogue et *al.*, 2012).

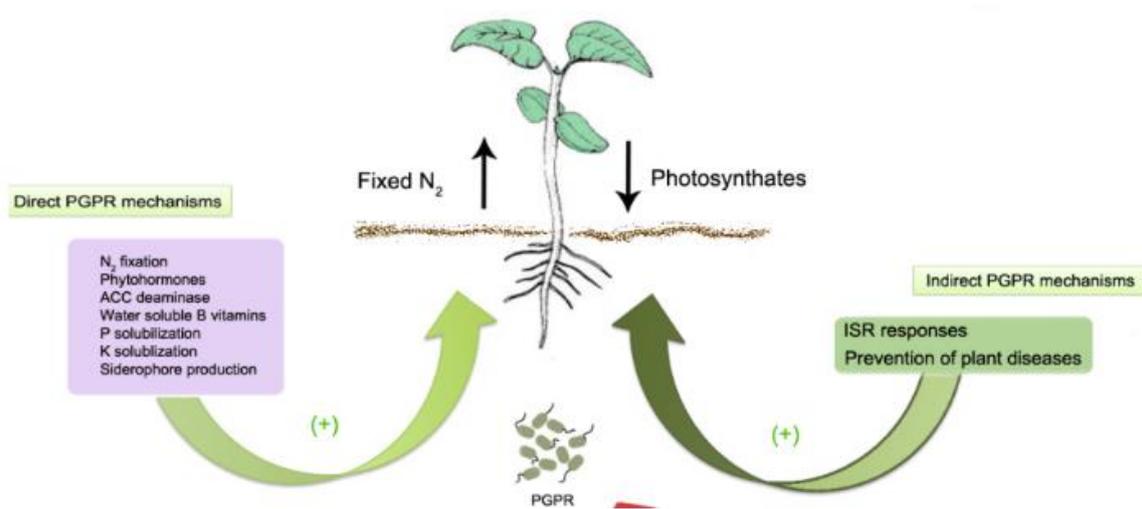


Figure 13. Mécanismes de stimulation de la croissance végétale par les PGPR

(García-Fraile *et al.*, 2015)

Des exemples de BCAs fongiques et bactériens agissant en tant que PGP sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques des exemples de BCAs fongique et bactériens et leur mode d'action PGP

Agents PGP	culture	mécanisme d'action	Références
<i>Trichoderma</i> sp.	Pin rouge (<i>P. resinosa</i>)	<i>Trichoderma</i> sp. mobilise l'azote (N) à partir des composés organiques <i>via</i> les champignons ectomychoriziens incapable d'assimiler directement l'azote du sol	Koide et <i>al.</i> (1998)
<i>T. harzianum</i> DB11	Fraise (<i>Fragaria ananassa</i>)	Amélioration de la disponibilité de N et P dans la rhizosphère ; fixation de phosphore et d'azote	Vestberga et <i>al.</i> (2004)
<i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> et <i>T. virens</i>	Pois	Fixation d'azote et de phosphore	Rudresh et <i>al.</i> (2005)
<i>Bacillus</i> sp	Pomme de terre	Synthèse d'auxine	Ahmed et Hasnain (2010)
<i>Bacillus</i> sp	Blé, aubergine, concombre, poivron	Solubilisation de Potassium	Han et <i>al.</i> (2006) Sheng et LY (2006) Basak et Biswas (2009)
<i>Azoarcus</i>	Riz	Fixation d'azote	Reinhold-Hurek et Hurek (1998)
<i>Bacillus</i> sp	Poivre, maïs	Production de siderophore	Beneduzi et <i>al.</i> (2012)
<i>Azotobacter</i>	Orge, avoine, riz, thé tournesoul, tabac bettrave, tabac, café noix de coco	Fixation d'azote	Wani et <i>al.</i> (2013)
<i>Azobacter</i>	Concombre	Synthèse de cytokinines	Aloni et <i>al.</i> (2006)

5.5. Biopesticides commerciaux

Les biopesticides peuvent être classés selon leur nature en trois grandes catégories : les biopesticides microbiens, les biopesticides végétaux et les biopesticides animaux (Leng et *al.*, 2011). Durant les dernières décennies, l'usage des biopesticides en protection des cultures a attiré l'attention mondiale en tant qu'alternative aux pesticides chimiques (Damalas et Koutroubas, 2018).

Actuellement, les biopesticides ne représentent que 5% du marché mondial de la protection des cultures dont 90% des biopesticides disponibles sont issus de la seule espèce *Bacillus thuringiensis* (Marrone, 2014 ; Olson, 2015 ; Kumar et Singh, 2015).

Des contraintes sont à la base de cette progression lente qui expliquent qu'il y a moins de substances actives de biopesticides enregistrées dans l'UE qu'aux États-Unis, en Inde, au Brésil et en Chine. Par exemple, sur le marché américain, plus de 200 produits sont disponibles, contre 60 produits analogues sur le marché de l'union européenne (UE) (Kumar et Singh, 2015). Ce niveau relativement faible des biopesticides disponibles dans l'UE est lié à la complexité de la réglementation européenne sur les biopesticides qui sont évalués selon les mêmes règles que les substances actives synthétiques (Balog et *al.*, 2017). En Europe, le développement des biopesticides nécessite une approche technologique plus élaborée qui suit le modèle de développement d'un produit chimique avec des tests d'efficacité qui dure longtemps, alors qu'aux États-Unis (bien que cela diffère d'un état à l'autre), le nombre de tests requis est limité (Balog et *al.*, 2017).

Il est toutefois à noter que les biopesticides sont devenus de plus en plus populaires au cours des dernières années, notamment dans l'opinion publique contrairement aux pesticides conventionnels. Leur croissance devrait dépasser celles des pesticides chimiques. Il est prévu que leurs commercialisation égalent celles des produits chimiques entre la fin des années 2040 et le début des années 2050 avec une introduction de nouvelles lignes directrices facilitant l'enregistrement des produits biopesticides potentiels, mais ces projections présentent des incertitudes majeures avec une grande flexibilité dans les régions telles que l'Afrique et l'Asie du Sud-Est (Marrone, 2014 ; Olson, 2015).

5.5.1. Avantages des biopesticides

Les biopesticides sont considérés moins nocifs que leurs homologues chimiques. Ils sont considérés plus écologiques puisqu'ils sont efficaces en petites quantités et se décomposent plus rapidement que les pesticides conventionnels (Ruchira et Shukla, 2012). Ils peuvent être aussi bien utilisés en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique. Ils sont spécifiques contre des pathogènes cibles et posent donc moins de problèmes de toxicologie.

Certains biopesticides microbiens peuvent présenter des bénéfices supplémentaires ajoutés à leurs rôles de protection. Ils peuvent permettre aux plantes de résister à des stress abiotiques. Ils peuvent aussi favoriser la croissance des plantes (PGP) telles que pour le cas des biopesticides à base des micro-organismes endophytes et/ou certaines rhizobactéries (Compant et *al.*, 2010 ; Wang et *al.*, 2012).

Dans certains produits commercialisés, les molécules bioactives emploient plusieurs modes d'action, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour limiter l'apparition des phénomènes de résistance (Akram, 2008).

5.5.2. Inconvénients des biopesticides

Le marché des biopesticides reste toujours limité comparé aux produits chimiques à cause de certains inconvénients :

- Une instabilité de leur activité protectrice qui dépend fortement des conditions biotiques et abiotiques du champ (Shishkoff et McGrath, 2002 ; Larkin et Fravel, 2002; Mendoza Garcia et *al.*, 2003).
- Une efficacité limitée dans la durée par rapport aux pesticides chimiques (Deravel et *al.*, 2014).
- Une spécificité d'action ciblant un spectre restreint de pathogènes, donc économiquement peu intéressant (Deravel et *al.*, 2014).
- Le coût de la production des biofongicides est élevé ; il est basé essentiellement sur le processus de fermentation dans des bioréacteurs industriels qui peuvent subir des variations dans la production ainsi que des problèmes de contamination (Fravel et *al.* 1999).
- La complexité des procédures d'homologation, de conditionnement et de formulation, ainsi que le coût élevé de la mise sur le marché des biopesticides surtout en Europe et au Canada, contrairement aux Etats Unis. Ces pays exigent des tests toxicologiques plus élaborés ainsi qu'une démonstration approfondie du potentiel fongicide du produit concerné sur plusieurs saisons et pour des régions géographiques particulières (Collins et Jacobsen, 2003; Damalas et Koutroubas, 2018).

5.5.3. Développement d'un biopesticide

Le développement d'un biopesticide microbien comprend plusieurs étapes (Figure 14). Cette procédure commence par l'échantillonnage et l'isolement des microorganismes. Ensuite vient le criblage de l'activité antagoniste *via* une série de tests d'évaluation *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une évaluation de l'efficacité des BCA retenu dans des conditions plus réelles (serre, champs...). Les différentes étapes sont précisées ci-dessous

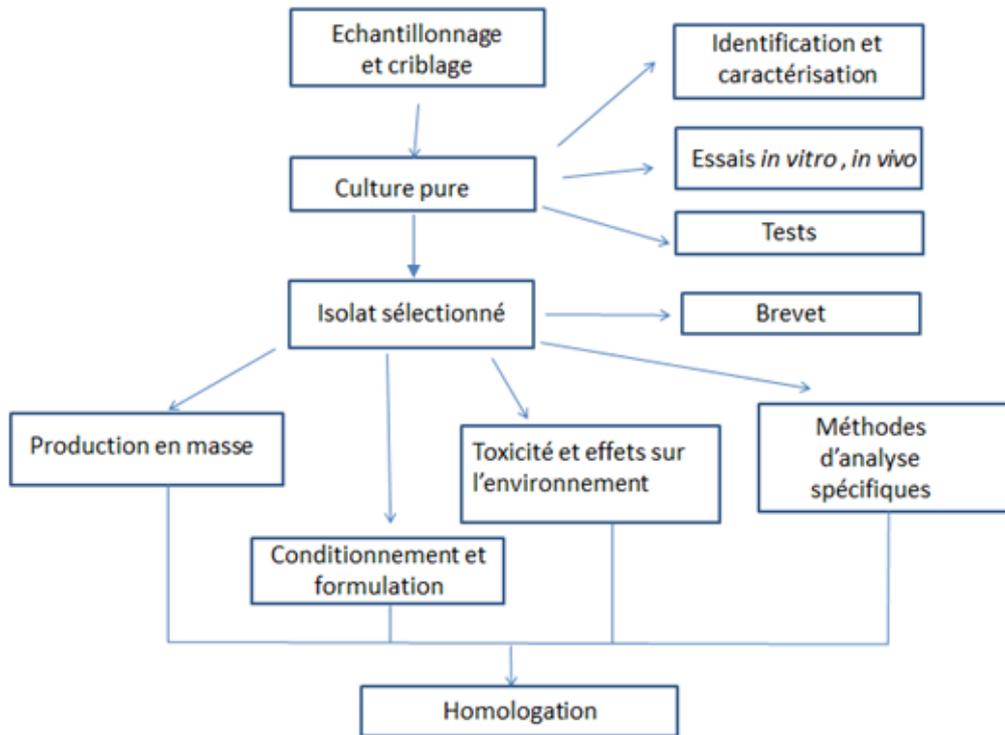


Figure 14. Démarche employée pour le développement d'un biopesticide depuis le criblage d'une collection d'organismes (Montesinos, 2003)

5.5.3.1. Criblage de l'activité antagoniste des microorganismes

Le dépistage de l'activité antagoniste des microorganismes vis-à-vis du pathogène cible est une étape critique. La méthode de criblage est déterminante dans le processus de sélection du BCA.

Pendant cette étape, une collection d'isolats est évaluée. Par exemple la collection TrichobankTM, qui comprend plus de 2000 isolats de 21 *Trichoderma* spp. a été utilisée avec succès pour développer des biopesticides, tels que SentinelTM, destinés à lutter contre la pourriture grise de la vigne causée par *Botrytis cinerea* (Stewart et al., 2010). La base de données associée à TrichobankTM regroupe les caractéristiques des *Trichoderma* spp. de cette collection, leurs capacités de biocontrôle, les agents pathogènes cibles, les plantes hôtes, le mode d'action et la niche environnementale de chaque isolat (Glare et al., 2012). La méthode du criblage cible généralement un mécanisme d'action donné, telle que l'antibiose, le parasitisme, la compétition ou l'induction de défenses des plantes hôtes.

Les isolats sélectionnés après ce criblage primaire sont ensuite soumis à des essais biologiques d'efficacité dans des environnements contrôlés à petite échelle sur l'agent pathogène (sous serre) et à grande échelle (*in situ*) afin d'établir la capacité de performance du BCA sur le terrain. Ces tests sont nécessaires pour le développement de produits à base de BCA. Une corrélation entre le test de biocontrôle *in vitro* et les tests de performances au champ détermine l'efficacité du BCA (Fravel, 2005).

D'autres critères de sélection sont aussi pris en compte, l'efficacité de produit antagoniste à de faibles doses ainsi que le mode d'action de BCA (production des métabolites bioactives, mycoparasitisme...) contre le pathogène cible (Montesinos et Bonaterra, 1996).

Plusieurs études ont souligné l'impact des critères environnementaux (Température, pH, lumière, humidité, type de sol, hôte...) sur la performance des BCAs (Larkin et Fravel, 2002 ; Huang et *al.*, 2000). L'efficacité des microorganismes endophytes est affectées par un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques y compris le précédent cultural et le type du sol (Barea, 2015 ; Berg et Smalla, 2009; Peiffer et *al.*, 2013). La capacité de colonisation des BCAs peut également être affectée par le génotype de la plante hôte (Briones et *al.*, 2002).

La compréhension de la biologie du BCA, du pathogène cible, des interactions existantes avec la plante hôte et les autres microorganismes du sol ainsi que les variations des facteurs de l'environnement est essentielle avant le processus de développement industriel du biopesticide (Grosch et *al.*, 2012; Parnell et *al.*, 2016).

Des tests de biosécurité sont essentiels pour éviter les effets non cibles du biopesticide sur la plante hôte et l'environnement. Dans le cas des BCAs bactériens, un test d'hypersensibilité chez la plante de tabac indique une absence de pathogénicité de BCA sur les plantes (Montesinos, 2003). Des études toxicologiques des biopesticides sont essentielles pour la protection de la santé des consommateurs. Elles sont réalisées sur des rats par voie orale pour déterminer la dose létale (DL50) (Kemi, 1998; Montesinos, 2003).

Des tests supplémentaires sont aussi effectués pour la détection des métabolites secondaires toxiques susceptibles d'être synthétisés par le BCA en fonction des conditions de fermentation (Kemi, 1998).

5.5.3.2. Formulation des biopesticides

La formulation d'un produit biopesticide est un procédé important dont le succès dépend de certains facteurs :

- La stabilité des ingrédients actifs pendant le stockage à des températures allant -5 à 35°C ainsi qu'une durée de conservation minimale de deux ans à une température ambiante;

- La facilité de d'application et de la manipulation du produit;
- La protection contre des facteurs environnementaux défavorables et l'amélioration de l'activité des ingrédients actifs sur le terrain. Au cours de cette étape, des analyses spécifiques sont nécessaires pour contrôler la qualité du biopesticide microbien ou du principe actif dérivé d'un BCA, comme sa traçabilité, l'analyse des résidus et son impact sur l'environnement (Scheda et *al.*, 2000; Parnell et *al.*, 2016).

Une bonne formulation fournira donc des conditions optimales pour la viabilité des micro-organismes sur les racines ou sur les feuilles afin d'obtenir les bénéfices optimaux souhaités après application sur les plantes pour gérer le pathogène cible (Ravensberg, 2011 ; Parnell et *al.*, 2016). Une amélioration des performances du biopesticide sur le terrain, sa durée de vie ainsi que de la stabilité du produit peuvent être réalisés en ajoutant des composés spécifiques au principe actif (Ravensberg, 2011; Parnell et *al.*, 2016). Une formulation comporte principalement des ingrédients actifs des microorganismes et des adjuvants/additifs (agents de suspension et de protection contre les UV, agents antimicrobiens, phagostimulants, adhésifs) pour une meilleure protection contre les conditions environnementales, une plus grande viabilité de l'agent biologique ou des composés microbiens, ainsi qu'une amélioration de la bioactivité et de la stabilité au stockage (Rhodes, 1993; Gasic et Tanovic, 2013).

À l'échelle mondiale, les biopesticides sont actuellement disponibles sur le marché sous forme de formulations sèches pour une application directe tels que les poussières (DP), les poudres pour la préparation de semences (DS), les granules (GR) et les microgranules (MG) ; les formulations sèches pour la dilution dans de l'eau (granules dispersables dans l'eau (WG)) et les poudres mouillables (WP); les formulations liquides pour la dilution dans de l'eau (les émulsions, les suspensions concentrées (SC), les dispersions huileuses (DO), les suspo-émulsions (SE), les suspensions gélules (CS) ainsi que les formulations liquides à faibles volume (Knowles, 2005, 2006; Singh et *al.*, 2012, 2014).

5.5.3.3. Homologation des biopesticides

Avant l'exploitation commerciale d'un pesticide microbien, sa protection juridique en tant qu'invention biotechnologique peut être assurée au moyen d'un brevet. Cependant, un brevet n'est pas une autorisation pour un usage commercial. Malgré le nombre relativement élevé de brevets pour biopesticides, seuls quelques-uns se sont matérialisés dans un registre d'utilisation agricole (Montesinos, 2003).

Bien que la directive européenne encourage l'accélération de la mise en place des biopesticides à base des micro-organismes pour la commercialisation, le processus d'homologation du produit reste très long et coûteux (Balog et *al.*, 2017). Plusieurs informations sont nécessaires pour l'homologation d'un biopesticide, en général : le nom systématique et nom commun du BCA, la description morphologique du bioagent, les détails du processus de fabrication, les résultats des tests de toxicité chez les mammifères et sur l'environnement ainsi que l'analyse des résidus (Fravel, 2005).

L'homologation des biopesticides dépend de règles spécifiques de chaque pays. Par exemple, en union européenne, le processus d'enregistrement de ces produits est tenu par la direction de la protection de la santé des consommateurs (Montesinos, 2003), dont le processus d'homologation est très long ; il dure en moyenne sept ans en comparaison aux États-Unis où le processus ne dure en moyenne que deux ans et dont l'enregistrement de ces produits est autorisé par l'Office of Pesticide Programs de l'Agence de protection de l'environnement (EPA) (Montesinos, 2003; Balog et *al.*, 2017).

Plusieurs contraintes prolongent le processus d'homologation en UE:

- Il n'existe pas d'harmonisation claire entre les autorités des différents pays membres permettant une garantie de la circulation libre des produits biopesticides dans les pays ayant des conditions environnementales comparables afin de faciliter cette coopération, ce qui explique que la charge administrative est très coûteuse pour les états membres.
- La procédure d'homologation est basée sur des règles développées à l'origine pour les pesticides synthétiques.

5.5.3.4. Quels sont les caractéristiques requis pour faire un 'bon BCA' ?

Le BCA devrait posséder les caractéristiques suivantes ; une efficacité à de faibles concentrations, une faible exigence nutritionnelle, une stabilité génétique, une importante capacité de survie et d'adaptation aux différentes conditions environnementales, une polyvalence d'efficacité sur divers pathogènes et diverses plantes hôtes, une production en masse aisée et peu coûteuse, une facilité de préparation et une efficacité de produit formulé, un pouvoir de résistance aux pesticides, une compatibilité avec d'autres traitements, une stabilité dans la croissance et une efficacité biologique ainsi qu'une absence de phytotoxicité et de pathogénicité vis-à-vis de l'homme et les composantes de l'environnement (Jijakli, 2003; Takors, 2012).

5.5.4. Exemples de biopesticides commercialisés contre *Pythium* spp et *Phytophthora* spp

Certains biopesticides fongiques et bactériens à activité antifongiques et anti-oomycètes commercialisés dans le monde sont cités dans le tableau 6.

Tableau 6. Exemples de biopesticides à base de microorganismes homologués et commercialisés à travers le monde vis-à-vis des champignons et des oomycètes (*Pythium* spp et de *Phytophthora* spp)

BCA	Nom commercial et /ou fournisseur	Pathogènes Cibles	Pays	Références
<i>Gliocladium virens</i>	Soil Guard 12GTM Certis	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium</i> spp.	U.S.	
<i>Gliocladium virens</i>	GuardTM, GliomixTM	<i>Pythium</i> spp.		Nelson (2004)
<i>T. harzianum</i> Borregaard	RootShieldTM, BioTrek 22GTM, SupresivitTM, T- 22GTM, T22-HB TM BioWorks, Wilbur- Ellis,	<i>Pythium</i> spp.	U.S., Europe	
<i>Trichoderma</i> . sp.	PromotTM, <i>Trichoderma</i> 2000, Biofungus J.H. Biotech, Mycontrol, Ltd., De Ceuster	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.	U.S., Belgium	
<i>T. viride</i>	Trieco Ecosense Labs	<i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.,	India	
<i>T. viride</i>	TVA	<i>Pythium aphanidermatum</i>		Muthukumar et al. (2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>P. aeruginosa</i>		<i>Pythium aphanidermatum</i>		Shrestha et al. (2014)
<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Mycosubtilin</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>		Leclere et al. (2005)
<i>B. pumilus</i>	GB34TM	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>	USA	Nelson (2004)
<i>T. gamsii</i> ICC080		<i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp.,		Bonattera et al. (2012)

		<i>Sclerotium</i> spp., <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Verticillium</i> spp		
<i>T. asperellum</i> ICC012 T11 et TV1		<i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Sclerotium</i> spp., <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Verticillium</i> spp.	Europe	Bonatterra et al.(2012)
<i>Gliocladium</i> <i>catenulatum</i> J1446		<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Didymella</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Helminthosporium</i> et <i>Penicillium</i> spp		
<i>Gliocladium virens</i> GL-21	SoilGard	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i>		
<i>Gliocladium</i> <i>catenulatum</i>	Primastop	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Botrytis</i>	Finland	
<i>Glicocladium virens</i>	GuardTM, GliomixTM	<i>Pythium</i>		Nelson (2004)
<i>B. subtilis</i> GB03	Companion (Liquid)	<i>Botrytis</i> , <i>Rhizocotonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>	.	
<i>Pseudomonas</i> <i>Fusarium</i> spp	cepacia INTERCEPT	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i>		
<i>Streptomyces</i> <i>griseoviridis</i>	Mycostop	<i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Alternaria</i>		
<i>Streptomyces</i>	Actinovate	<i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>		
<i>Reynoutria</i> <i>sachalinensis</i>		<i>Botrytis</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Verticillium</i>	.	
<i>B. subtilis</i> MBI600	SubtilexTM Becker.	<i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Pythium</i> spp	USA	
<i>Pythium oligandrum</i>	Polygandron TM	<i>Pythium ultimum</i>	Slovak Republic	Aneja et al. (2016)
<i>B.subtillis</i> QST 713	Cease	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i>		Aneja et al. (2016)

Objectif de thèse

L'objectif de la présente thèse est la sélection de microorganismes (BCAs) ayant un pouvoir anti-oomycète important ainsi que la détermination des principales actifs responsables de cette activité dans le but de rechercher une alternative à la lutte chimique pouvant être appliquée dans la gestion de dépérissement du pommier causé par les isolats de Pythiacées.

En se référant au schéma de la figure 14, mes travaux de thèse se situent dans une démarche similaire traitant les premières étapes de sélection des BCAs. Les étapes étudiées dans cette thèse sont illustrées dans le schéma ci-dessous (Figure 15) dans un but de développement d'un biopesticide microbien.

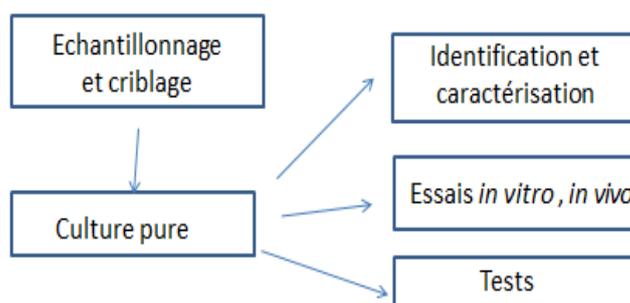


Figure 15. Les premières étapes du développement d'un biopesticide

Notre approche expérimentale a consisté, dans un premier temps, à évaluer l'activité anti-oomycète *in vitro* d'une collection d'isolats fongiques et bactériens afin de sélectionner les meilleurs isolats inhibiteurs et d'étudier leur taxonomie. Par la suite, un test en conditions contrôlées a été mis en place pour l'évaluation de l'efficacité de leur usage sur la sévérité de la maladie sur des porte-greffes du pommier.

Finalement nous avons testé l'activité anti-oomycète des filtrats de culture des isolats retenus en nous focalisant sur le mécanisme d'antibiose comme mode d'action des BCAs. Cette étape nous a permis de sélectionner l'isolat *Aspergillus westerdijkiae* (A7) en tant que meilleur candidat avec 100% d'inhibition sur la croissance mycélienne des isolats Pythiacées,

ce qui nous a amené à nous intéresser aux principaux actifs responsables de cette inhibition. Pour cela, une succession de tests a été effectuée au laboratoire de Chimie des Produits Naturels Fongiques (CPNF) du Muséum nationale de l'histoire naturelle Paris, sous la direction de Didier Buisson et avec l'aide de Stéphane Mann menant à la purification, à l'isolement et à la caractérisation de (la) ou (les) molécule(s) responsable de l'activité anti-Pythiacées.

Chapitre II

Sélection *in vitro* de microorganismes contre des *Pythiacées* et évaluation *in planta* de leur potentiel de protection et de stimulation de la croissance végétale

Publication 1

Biocontrol and growth promotion potential of combined application of *Trichoderma simmonsii* and *Aspergillus westerdijkiae* in Apple root stock dieback

Yosra Ben M'Henni, Ibtissem Ben Salem, Mounira Souli, Danièle Debieu, Slim Tounsi, Sabine Fillinger and Naima Boughalleb-M'Hamdi

Introduction

Afin de sélectionner des microorganismes (BCAs) ayant un pouvoir anti-oomycète important, je disposais d'une collection de 13 isolats fongiques appartenant au laboratoire de phytopathologie d'ISA chott Mariem, Sousse. Ces isolats sont issus du sol tunisien et collectés au cours de plusieurs années avant mon arrivée. Par ailleurs, 15 isolats bactériens appartenant à la collection bactérienne de l'équipe Biopesticides (LB), Sfax, Tunisie ont été retenus pour le criblage. Ces isolats avaient été sélectionnés pour leurs capacités antifongiques auparavant (Boughalleb-M'Hamdi et *al.*, 2018). Comme ils avaient été caractérisés seulement morphologiquement, j'ai défini à quel genre et/ou espèce ils appartiennent par taxonomie moléculaire.

J'ai procédé à l'évaluation du potentiel anti-oomycète de cette collection contre six isolats appartenant à la catégorie des Pythiacées à plusieurs niveaux. Deux tests de criblages ont été effectués visant à sélectionner les isolats agissant par antibiose afin d'identifier par la suite les principaux actifs responsables de l'activité anti-oomycète. Le premier test correspondait à la méthode de la confrontation directe entre isolat et pathogène afin de retenir le(s) isolat(s) agissant à distance, soit par l'excrétion de molécules diffusibles. Les isolats antagonistes retenus ont subi un second test mettant en jeu le filtrat de leurs cultures.

À partir des résultats obtenus du criblage, nous avons évalué l'activité protectrice des trois isolats fongiques et bactériens retenus *in planta* (sur des porte-greffes de pommier) contre deux isolats de Pythiacées. Enfin, j'ai évalué l'effet des mêmes isolats sur le développement de la plante pour tester s'ils affectaient la croissance de la plante, y compris en absence de pathogène. Cette étude nous paraissait importante, car certaines espèces bactériennes du genre *Bacillus* sont connues pour leur capacité d'agir en tant que « PGP ». Un autre aspect important que nous avons abordé lors de nos tests *in planta* était la synergie ou l'antagonisme potentiel entre plusieurs BCAs. À notre connaissance, cet aspect a fait l'objet de peu d'études (Xu et *al.*, 2011; Jambhulkar et *al.*, 2018). Ainsi, le potentiel anti-oomycète et le potentiel de stimulation de croissance végétale des antagonistes sélectionnés ont été testés seul ou en combinaison avec un ou deux autre(s) isolats sur les plants de pommier.

La plupart des expériences *in vitro* et la taxonomie moléculaire ont été réalisées dans l'unité BIOGER du centre INRA de Grignon sous la direction de Sabine Fillinger et de Danièle Debieu. Les expérimentations *in planta* ont été réalisées au laboratoire ISA chott Mariem à Sousse sous la direction de Mme Boughalleb M'hamdi Naima.

Cette partie de la thèse a été soumise sous forme de publication intitulée « Biocontrol and growth promotion potential of combined application of *Trichoderma simmonsii* and *Aspergillus westerdijkiae* in Apple root stock dieback» à la revue « European Journal of Plant Pathology ».

Biocontrol and growth promotion potential of combined application of *Trichoderma simmonsii* and *Aspergillus westerdijkiae* in Apple root stock dieback

Yosra Ben M'Henni ^(1,2), Ibtissem Ben Salem ⁽¹⁾, Mounira Souli ⁽¹⁾, Danièle Debieu ⁽²⁾, Slim Tounsi ⁽³⁾, Sabine Fillinger ⁽²⁾ and Naima Boughalleb-M'Hamdi ^{(1)*}

¹ Department of Biological Sciences and Plant Protection, High Institute of Agronomy of ChottMariem, 4042 Sousse, UR13AGR03, University of Sousse, Tunisia

² UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78850 Thiverval-Grignon, France

³ Centre of Biotechnology of Sfax. Laboratoire des Biopesticides. Tunisia

*Corresponding author: Naima Boughalleb-M'Hamdi

Email: n.boughalleb@laposte.net or n.boughalleb2017@gmail.com

Tel: [\(00 216\)73 327 534](tel:(00216)73327534)

Fax: [\(00 216\)73 327 591](tel:(00216)73327591)

Abstract

Apple tree dieback is a prominent soil-borne Pythiaceae disease which is responsible of severe damages and tree losses in numerous apple orchards in Tunisia. Our study aimed to evaluate the *in vitro* and *in planta* anti-oomycota potential of new fungal and bacterial isolates from Tunisia. The fungal isolates were classified as *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Penicillium* spp.; all bacterial isolates were *Bacillus* spp. of the *subtilis* clade. The fungal isolates induced the strongest *in vitro* mycelial growth inhibition (>40%) towards all *Pythiaceae* isolates, in comparison to the bacterial isolates (40%). The secretion of active anti-Pythiaceae molecules during axenic growth was more important for the fungal isolates than for the bacterial strains. In particular, *Aspergillus westerdijkiae* isolate A7 and *Trichoderma simmonsii* A2 produced the strongest inhibition profiles with their culture filtrate. These fungal isolates and the *Bacillus* strain B2 were tested for preventive and curative activity against *Pythiaceae* on apple rootstocks alone or combined. *T. simmonsii* A2 was the most active when applied preventively. Similarly, the combination of *Bacillus* strain B2 and *A. westerdijkiae* A7 produced also a good protection against *Pythiaceae* species. Both fungal antagonists *T. simmonsii* A2 and *A. westerdijkiae* A7 led to increased curative activity. These three BCAs (A2, A7 and B2) also had an additional beneficial effect expressed as plant growth promotion

on root and shoot, alone or in combination. This study reveals the potential of the isolated strains as biocontrol agents against apple tree dieback.

Keywords Apple tree dieback. anti-oomycete. microbial interaction. plant growth

Introduction

Apple (*Malus communis*) is an economically important crop in Tunisia, but threatened by a severe soil-borne oomycota disease named apple tree dieback due to *Phytophthora*, *Pythium* and *Phytophthora* species which have been observed since 1996 (Souli et al. 2010; Souli, 2016). Typical symptoms of this disease in apple plants include cankers, necrosis and rot in the collars and roots, which ultimately cause severe damages and tree losses in numerous apple orchards. Many causal agents have been detected such as *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora inundata*, *Pythium* sp., *Pythium indigoferae*, *Pythium irregulare*, *Pythium rostratifingens*, *Pythium sterilum* and *Pythium undulatum* (Souli et al. 2014).

The control of diseases caused by Pythiceae include good agriculture practices, well drained plantations, the selection of resistant rootstock varieties, water and soil management and the use of chemical fungicides, mainly curatively (Pscheidt 2019). One of the most efficient protection strategies is the application of Metalaxyl and fosetyl-Al, but with the emerging and raising problem of resistance selection in several *Phytophthora* species (Parra and Ristaino 2001, Hu et al. 2008; Dunn et al. 2010; Larousse and Galiana 2017).

The excessive use of fungicides may cause the accumulation of toxic and harmful pesticide residues, the decrease of beneficial soil microorganisms, soil contamination as well as serious ecological problems and human health hazards (Larousse and Galiana 2017). Therefore, biocontrol strategies attract worldwide attention, because they are considered as promising alternative to the excessive use of chemicals in agriculture but also to solve the problem of fungicide resistant pathogens (Christopher et al. 2010; Singh 2014; Mahmood et al. 2015). The efficient use of biological control agents (BCAs) is a potentially important component of sustainable agriculture. Microbial BCAs (bacteria or fungi) act through different mechanisms which include mycoparasitism, antibiosis, competition, induced plant resistance and the inhibition of enzymes involved in plant pathogenicity (Elad and Freeman 2002; Punja and Utkhede 2003). Individual biocontrol mechanisms have been shown to be predominant for some BCAs but more than one mechanism may operate together in a given BCA isolate (Elad 2000; Yedidiaa et al. 2000). *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., are among the best-known fungal biocontrol agents (Hajjehghrari et al. 2008;

Boughalleb-M'Hamdi et al. 2018), with a wide spectrum of biotypes living in the rhizosphere and able to successfully colonize the plant epidermis (Cardona and Rodriguez 2006; Meraj-ul and Nandkar 2012). These fungal BCAs are excellent producers of novel secondary metabolites (Reino et al. 2008 ; Sanchez et al. 2012). Isolates of these species have been registered as effective antagonists of *Pythium* spp. (Maisura and Patel 2009) and *Phytophthora* spp. (Mpika et al. 2009) acting through substrate competition, antibiosis and parasitism (Belen Suarez et al. 2005). Other studies reported the biocontrol effect of *Trichoderma* spp. against oomycota isolates; e.g., *T. harzianum* against *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora citrophthora* and *Pythium* spp. (Singh and Islam, 2010) and especially their positive effect on the physiological and biochemical responses of plants (Contreras-Cornejo et al. 2016) or on plant growth and primary root development (Rippa et al. 2010; Shi et al. 2016). In the case of *Aspergillus* spp. isolates of three species, namely *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. repens* were shown to inhibit growth of *Phytophthora palmivora* *in vitro* by the production of antifungal metabolites (Adebola and Amadi 2010).

Various *Bacillus* spp. strains have been reported as antagonistic to several soil-borne plant pathogens, as well as plant growth stimulators (Nadeem et al. 2015). Biopesticides based on microbial solutions of *Bacillus* species have been developed especially to control fungal diseases, pre- and post-harvest (Nicot et al. 2016; Klopper et al. 2004; Berg 2009; Cazarola et al. 2007; Arrebola et al. 2010). *Bacillus* spp. can also promote plant growth directly by providing the plant with nutrients or growth hormones, or indirectly by decreasing the pathogen's growth (Lugtenberg and Kamilova 2009).

The use of mixtures of biofungicides has been successfully adopted in several crops exploiting their synergistic potential (Xu et al. 2011). A range of biocontrol mechanisms may operate in mixed BCA populations (Elad and Stewart 2004; Guetsky et al. 2001; Guetsky et al. 2002; Whipps 2001), with direct and indirect interactions between different BCAs. Combined use of two BCAs may lead to increased (Le Floch et al. 2009; Yobo 2010), reduced (Bora et al. 2004; Elliott et al. 2009; Xu et al. 2010), or similar (Dooley and Beckstead 2010; Janousek et al. 2009; Xu et al. 2010) biocontrol efficacy relative to the standalone agent. Although various biocontrol products have been introduced in the market, efficiency and reproducibility are much lower than with synthetic products. Especially, their usage against soil-borne oomycetes is still scarce.

Therefore, the success to control oomycetes needs the discovery and development of new and more efficient BCAs. An additional possibility may be the combined use of bacterial and

fungal BCAs against the same disease. In this study, we searched for a new possibility to use fungal or bacterial BCAs as an efficient strategy against apple tree dieback. We tested the anti-oomycete potential of selected isolates *in vitro* and evaluated *in planta* their potential to control apple dieback, individually as well as in double- or triple combinations.

Materials and Methods

Pathogenic strains and culture conditions

Four *Pythium* species and two *Phytophthora* species were used in this study. These isolates originating from Tunisian apple tree (Table 1) belong to the collection of the Laboratory of Plant Pathology in ISA Chott-Mariem, Sousse, Tunisia. All isolates were grown on solid V8 medium (200 ml l⁻¹ V8 juice, 2 g l⁻¹ CaCO₃ and 15 g l⁻¹ agar) at 25 °C in the dark for 1 week. For further biological analyses, they were grown on Potato-Dextrose-Agar (PDA, Difco™, BD Le Pont de Claix, France) at 26°C for three to five days.

Biocontrol agents and culture conditions

Antagonistic fungal isolates

Thirteen fungal isolates (A1-A13, Table 2) obtained from different soil samples and plants located in Tunisia and belong to the collection of the laboratory of Plant Pathology in ISA Chott-Mariem, were selected according to their potential antifungal capacities against other phytopathogens (unpublished data).

Antagonistic bacteria

Fifteen bacterial strains (B1-B15, Table 3) used in this study provided by the strain collection of Biopesticides Team ; Laboratory of Biopesticides (LB), CB-Sfax, Tunisia. The bacterial strains were maintained for long-term storage at -80°C using glycerol 10 %. Fresh bacterial cultures used in experimentation were grown at 30°C on Luria-Bertani broth (LB, Difco™, BD Le Pont de Claix, France) agar plates.

Molecular characterization of the BCA isolates

Fungal mycelia for DNA extraction were harvested from solid cultures on PDA. Approximately 2 à 5 mg of freeze-dried fungal mycelium was ground in a FastPrep cell disruptor (MP Biomedicals, Illkirch, France) for two 30-second runs at a speed of 5 rpm. Ge-

nomic DNA was extracted with the DNEasy Plant Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Bacterial genomic DNA was extracted from the liquid cultures of the *Bacillus* strains, grown in LB medium for 48 h at 30°C, according to standard procedure of alkaline lysis (Green and Sambrook 2012).

Primers used for DNA amplification and sequencing are listed in Table 4. The ITS region of fungal rDNA was amplified and sequenced using the universal primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). The comparison with the sequences available in the databases allowed genus identification. *Genus specific loci* were used for species identification (Table 4). These *loci* were respectively for *Trichoderma* spp. *EF1 α* with specific primers EF1-728F and TEF1LLE (Jaklitsch and Voglmayr 2015), for *Penicillium* spp. β -tubulin with primers Bt2a and Bt2b (Visagie et al., 2014), for *Aspergillus* spp. calmodulin (primers CMD5 and CMD6) (Samson et al. 2014). For bacterial strains, 16S rDNA was amplified and sequenced using primers A1 and B6 (Manceau and Horvais 1997) (Table 4).

Phylogenetic analysis of BCAs

For taxonomic determination of each isolate, the ITS sequences and *genus specific loci* were compared to those in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST search program (Altschul et al. 1997). The reference nucleotide sequences of type-strains were used to construct phylogenetic trees by www.phylogeny.fr with default parameters (MUSCLE alignment, Gblocks curation, PhyML and TreeDyn). Nucleotide sequences and phylogenetic trees of the analysed BCAs are listed in supplemental data.

Evaluation of in vitro anti-pythiaceae activity

Anti-oomycete activity of fungal and bacterial BCAs was tested against the phytopathogenic oomycetes listed in Table 1 by the direct dual culture method on PDA plates as described by Boughalleb-M'Hamdi et al. (2018). Mycelial plugs (5 mm diameter) of pathogen and antagonist (7 days-old culture) were transferred to a single PDA plate (9 cm diameter). Both plugs were placed on either side of the plate separated by a distance of approximately 5 cm. A plug of PDA medium was used as negative control together with the pathogen (C₀). Three replicates for each pathogen-BCA pair were performed. Plates were incubated at 26°C for five to seven days in the dark and the experiment was repeated twice in time (n=6).

The growth inhibition percentage (%) was calculated at the last day of incubation using the following formula: $I \% = [(1 - C_n) / C_0] \times 100$; where I is the percentage of growth

inhibition, C_n : Mean pathogen colony diameter in the presence of the antagonist; C_0 : Mean diameter of the control colony.

The *in vitro* growth inhibition efficiency of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. by bacterial strains was determined by applying a dual culture technique (Sadfi-Zouaoui et al. 2008). Two mycelial plugs (5 mm in diameter), taken from the edge of *Pythiaceae* cultures, were placed at each side of a freshly applied bacterial strip. The distance between bacteria and oomycetes was 2.5 cm. Two pathogen plugs was used as negative control without bacterial strip. Plates were then incubated at 26°C for 5 days. The percentage of mycelial growth inhibition was calculated by the formula of growth inhibition mentioned above.

Effect of culture filtrate produced by BCAs on the growth of Pythiaceae isolates or Preparation of sterilized liquid culture filtrates

The next step in our screening was to test the anti-oomycete activity of secreted, non-volatile molecules produced by selected BCAs against pathogenic *Pythiaceae*.

Fungal and Bacterial BCAs were selected to test the antagonistic activity of non-volatile molecules produced in their culture filtrates against the four *Pythiaceae* isolates BGA1, B18, KS18S, and BME. The BCAs were cultivated as follows. Mycelial plugs of fungal antagonist were placed in 100 ml of liquid Potato Dextrose Broth (PDB, Difco™, BD Le Pont de Claix, France) and incubated during three days at 26°C under shaking (150 rpm). The bacterial antagonists were grown in liquid LB medium (100 ml) for 48 h at 30°C and 150 rpm.

The culture medium was recovered by two successive filtration steps to eliminate fungal spores, the second one through a 0.2 µm sterile filtration unit. These sterile filtrates were added to 20 ml of PDA at a final concentration of 10% (v/v); plates without filtrate served as control. 5 mm mycelial plugs of the tested *Pythiaceae* strains were placed on these plates in three replicates and incubated at 26°C. The colony diameters of pathogens were measured after 72 h and growth inhibition was calculated as described above.

In planta antagonistic activity against *Pythiaceae*

To study the *in planta* anti-oomycete activity of BCAs against *Phytophthora inundata* (BGA1) and *Pythium undulatum* (BME), a pot culture experiment was conducted with single, binary, and tertiary combinations of BCAs under artificial inoculation.

The BCAs isolates of fungi (A2 and A7) and bacteria (B2) were selected according to their inhibition percentage determined from *in vitro* antagonistic assays. To prepare the inocu-

lum of *Phytophthora inundata* (BGA1) and *Pythium undulatum* (BME), plugs of these isolates were inoculated in the PDB (Potato-Dextrose-Broth) medium for 7 to 10 days with intermittent shaking at 200 rpm and the concentration was adjusted at 2.10^5 oospores ml^{-1} with sterile-distilled water before plants inoculation. Fungal BCAs isolates were incubated for 7 days at 26°C on PDA Petri dishes. Spores were harvested aseptically in sterile distilled water and concentration was adjusted to 10^7 spores ml^{-1} .

Bacterial strain B2 was cultivated in LB medium for 48 hr at 30°C with shaking at 200 rpm. Then, the bacterial suspensions were prepared at a final concentration of 10^{10} Colony forming units (CFU).

The pots of 3 months-old apple MM106 rootstock plants were arranged in a greenhouse in a randomized block designed in three replicates (4 plants / replicate). Two trials were performed, one for testing the preventive activity of the BCAs and one for testing their curative action. For the preventive test, apple rootstock plants were treated by spraying the BCA solution one week before pathogen inoculation and *vice versa* for the curative assay.

Both tests are intended to assess the effectiveness of the use of BCAs on dieback apple tree disease. The substrate used in the experiment consisted of a mixture of peat and vermiculite (1:1). The treatments were done by inoculating the plants of MM106 rootstocks by 30 ml of the spore suspension of each antagonist isolate.

The eight treatments applied were: (1) negative control: healthy plants control (treated with sterile distilled water); (2) positive control: plants inoculated with BME or BGA1 alone; (3) Plants inoculated with BME or BGA1 and A2; (4) Plants inoculated with BME or BGA1 and A7; (5) Plants inoculated with BME or BGA1 and B2; (6) Plants inoculated with BME or BGA1, A2 and A7; (7) Plants inoculated with BME or BGA1, A7 and B2 and (8) Plants inoculated with BME or BGA1, A2, A7 and B2.

Disease severity and plant growth parameters

Twelve weeks after inoculation for the preventive and curative assays, disease symptoms and plant growth parameters (shoot length, root dry biomass) were registered. Disease severity (DS) was estimated visually by assessing necrotic lesions on the roots and hypocotyls using the 0-3 rating scale to score the degree of infection as follows: 0, no symptom; 1, light or moderate rot on taproot, secondary roots and crown, light vascular discoloration in the stem; 2, severe rot on taproot, secondary roots and crown, with or without wilting and stunting, vascular discoloration in the stem; and 3, dead seedlings (Vakalounakis

and Fragkiadakis 1999). The DS percentage was determined according to the formula of Filion et al. (2003).

(%) Disease severity (DS) = \sum (degree of infection * number of plants with the same degree of infection) / (total number of plants * highest degree of infection)

To determine the root dry biomass, roots were dried at 70°C for 48 h in an oven prior to assess their dry weight. For shoot length, the aerial part of each plant was measured.

Plant growth stimulating activity of BCAs

Complementary to the anti-pythiaceae activity assays, we tested the plant growth promotion activity of the antagonistic isolates (BCAs) individually and in different combinations in an experiment conducted in parallel with the above described assay. The experimental design included the following treatments: (1) healthy plants control (treated with sterile distilled water); (2) plants inoculated with one single fungal BCAs; (3) plants treated with a single bacterial BCAs; (4) plants treated with two fungal BCAs; (5) plants inoculated with a combination of a fungal and a bacterial BCAs; and (6) plants treated with a combination of three BCAs (two fungi, one bacterial strain). The experimental conditions and scorings were the same as for the anti-*Pythiaceae* assay.

Statistical Analysis

The data were analyzed by ANOVA using SPSS version 20.0 statistical software (SPSS, SAS Institute USA). Differences between treatments (*in vitro* and *in planta* anti-Pythiaceae activity assays) were determined by Duncan multiple range test at 5% of significance level.

Results

Molecular characterization of the fungal and bacterial BCA isolates

Thirteen fungal isolates and 15 bacterial strains of our collections, previously selected for their anti-oomycete potential were characterized according to ITS and *genus* specific *locus* sequences in order to determine species names of fungal BCAs (see for suppl. Data S1; Fig. S1). 16S sequences were used to determine the *genus* of bacterial BCAs (suppl. Data S5; Fig. S5). Fungal isolates belong to the *genera* *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Penicillium* (Table 2; suppl. Fig. S2). Most of them are *Aspergillus* spp (6/13), four are *Trichoderma* spp. and three are *Penicillium* spp. Three *Aspergillus* species were identified, namely *A. westerdijkiae* (A7,

A10, A13), *A. terreus* (A5) and *A. fumigatus* (A6). Four *Trichoderma* species were identified as *T. harzianum* (A1), *T. afroharzianum* (A4), *T. simmonsii* (A2) and *T. asperellum* (A3) and one *Penicillium* species, *P. chrysogenum* (A12). The bacterial isolates were identified as belonging to the genus *Bacillus* clade *subtilis* (Table 3, Fig. S5).

Evaluation of in vitro anti-Pythiaceae activity

As we were principally interested in BCAs acting through antibiosis, hence producing anti-oomycete compounds, we proceeded to two complementary *in vitro* growth assays (dual culture assay, inhibitory activity of culture filtrates). The dual culture assay in which BCAs and *Pythiaceae* species were grown on the same plate (as described in Materials and Methods) aimed to evaluate anti-oomycete activity over a distance through the action of diffusible compounds. Results of three replicates and two independent assays are reported in Tables 5 and 6, for fungal and bacterial BCAs, respectively.

Overall, fungal isolates led to at least 25% inhibition rates towards all *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. isolates with only one exception, *Penicillium chrysogenum* A12 (Table 5). Seven fungal isolates exhibited inhibition rates over 40% towards all tested oomycetes. The highest inhibition rates (and largest inhibition spectra) were obtained with *T. simmonsii* A2 and *Penicillium* sp A9 ranging from 52 to 67%. Fungal isolates, *Trichoderma harzianum* A1, *Trichoderma afroharzianum* A4, *Aspergillus westerdijkiae* A7, A10 and A13, reduced the mycelial growth of at least one *Phytophthora* sp. and one *Pythium* sp. isolate by more than 50%. We observed intrinsic variability within the genus *A. westerdijkiae*; for isolates A7, A10 and A13, the variability depended also on the tested oomycete species.

The confrontation of bacterial strains with *Pythiaceae* species revealed six strains (B5, B9, B10, B11, B13 and B14) with relatively low biocontrol activities, inhibiting growth at rates below 25%. The strongest anti-oomycete activity rates against at least two *Pythiaceae* isolates were recorded for five strains B4, B6, B8, B12 and B15 (Table 6). The highest rates of inhibition were found for B8 (39%) and B15 (37%), respectively towards *Phytophthora citrophthora* and *Pythium sterilum*.

Effect of BCA culture filtrates on the growth of Pythiaceae isolates

Six fungal BCAs (*T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A3, *T. afroharzianum* A4, *Penicillium* sp. A9, two isolates of *Aspergillus westerdijkiae* A7 and A13) were selected on the basis of the strongest *in vitro* growth inhibition profiles and five *Bacillus* spp. strains (B1, B2, B6, B8 and B9) with contrasted growth inhibition profiles.

Fungal culture filtrates obtained after 72 h of growth were tested against four *Pythiaceae* isolates: *Pythium undulatum* BME, *Phytophthora inundata* BGA1, *Pythium irregulare* KS18S and *Pythium indigoferae* B18. Bacterial culture filtrates (48 hrs of growth) were tested to evaluate the antagonistic activity against *Phytophthora inundata* (BGA1) and *Pythium undulatum* (BME). The results of the present investigation demonstrated that the growth inhibition rates with values more than 20% were obtained with culture filtrates at a final concentration of 10% (v/v) produced by the fungal BCAs *T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A3 and *A. westerdijkiae* A7 strains, but not by *T. afroharzianum* A4, the other *Trichoderma* species tested nor the other *A. westerdijkiae* strain A13, neither by *Penicillium* sp A9. The strongest inhibition profile against the four pathogenic isolates was found with the culture filtrate of *A. westerdijkiae* isolate A7 (growth inhibition rates >30%); but the antagonistic activities varied among the tested *Pythiaceae* (Fig.1).

Growth inhibition assays revealed that culture filtrates at a final concentration of 10% (v/v) of the bacterial strains B2 and B8 decreased mycelial growth of *Pythium undulatum* BME and *Phytophthora inundata* BGA1 by more than 20%; the highest growth inhibition being approximately 25% (Fig. 2). Strain B9 reduced growth of both pathogens only by 3 and 10%, respectively. The other two strains (B1, B6) exhibited very low (<2%) to no inhibition.

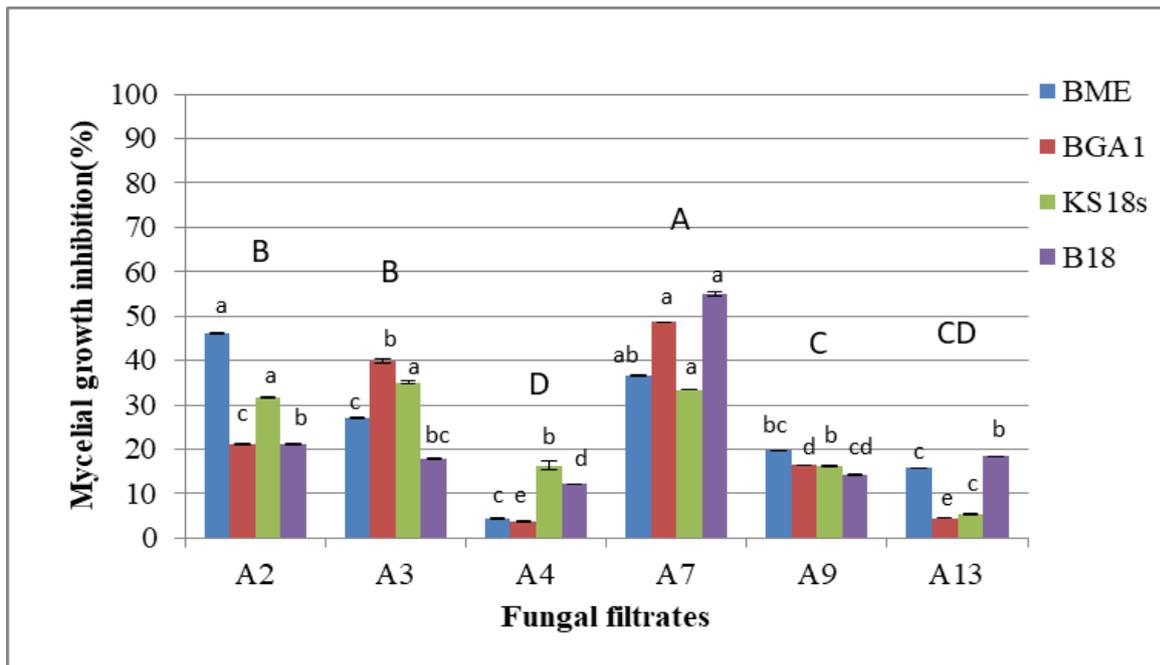


Fig 1. *In vitro* antagonistic activity of fungal BCA culture filtrates (A2, A3, A4, A7, A9 and A13) against *Pythium undulatum* (BME), *Phytophthora inundata* (BGA1), *Pythium irregulare* (KS18S) and *Pythium indigoferae* (B18), mean values \pm standard deviation (n = 3). Small letters indicate significant differences ($p < 0.05$) of different BCAs against the same *Pythiaceae* strain. Capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between BCA inhibition profiles (sum of inhibition rates)

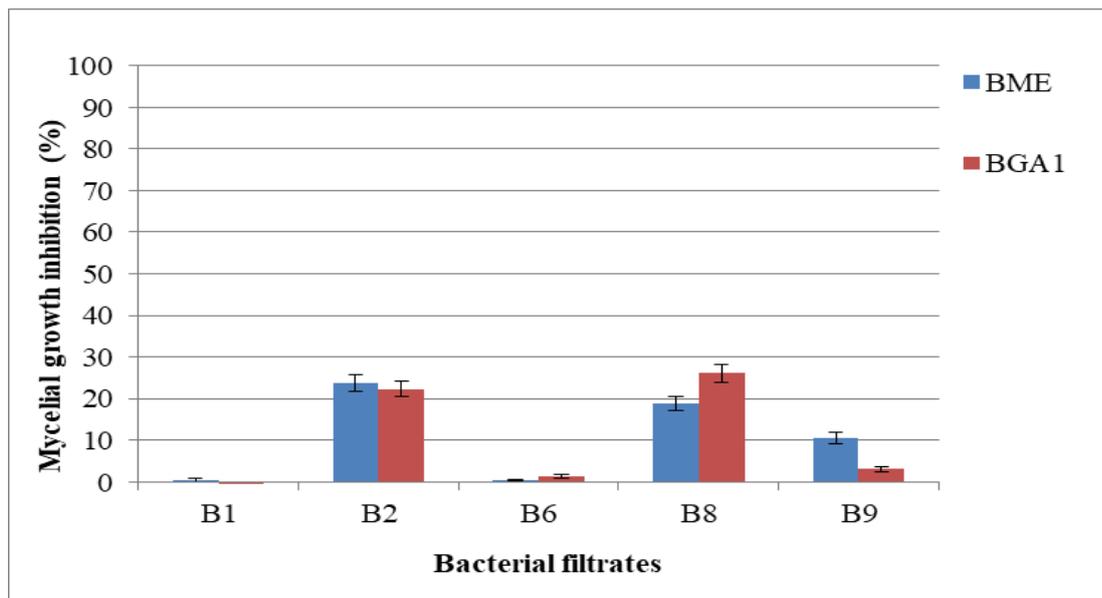


Fig 2. *In vitro* antagonistic activity of bacterial BCAs (B1, B2, B6, B8 and B9) at 10% (v/v) against *Pythium undulatum* (BME) and *Phytophthora inundata* (BGA1) after 72 h of incubation, mean values \pm standard deviation (n = 3).

***In planta* activity of selected fungal and bacterial BCAs against dieback disease on apple rootstocks**

According to the previous results of *in vitro* assays, the antagonistic effect of two fungal BCAs, namely *T. simmonsii* (A2) and *A. westerdijkiae* (A7), and of *Bacillus* spp. strain B2 was assessed against *Pythium undulatum* (BME) and *Phytophthora inundata* (BGA1) on young apple rootstocks. The effect of these BCAs was tested alone and in combination of two or three BCAs, preventively or curatively. Agronomic growth parameters (shoot length and root dry biomass) were measured and disease severity evaluated after twelve weeks. Considering *P. undulatum* (BME, Table 7), young apple rootstocks inoculated with the pathogen alone showed moderate disease severity (50-66%) with typical root rot resulting from *Pythium* infection. Fungal BCAs showed better efficiency against *P. undulatum*, when applied preventively than curatively. The *Bacillus* strain B2 applied *solo* did not have any protective effect against pathogen infection. The best protection against *P. undulatum* was achieved with combinations of BCAs. The association of *Bacillus* B2 improved the preventive activity of *A. westerdijkiae* A7. Curative activity was enhanced by the combination of fungal

BCAs (*A. westerdijkiae* A7 and *Trichoderma simonsii* A2). On the opposite, the combination of all three BCAs increased disease severity suggesting negative interactions between BCAs. Considering the growth parameters measured in the same assay, it seems that shoot length and root dry weight were at least as high as in the healthy control in all samples treated with one BCA, regardless of the time of application. In several cases, the growth parameters were even higher as in the healthy control (cells highlighted in yellow, Table 7). These results indicate that besides their anti-oomycete activity, the tested BCAs also may have some plant growth stimulating activity, particularly on root dry weight (*solo* or in double combinations).

Apple rootstock infection with *Phytophthora inundata* (BGA1) gave rise to a more severe disease (disease severity 70-79%; Table 8) than with *Pythium undulatum*. All BCAs alone significantly reduced the disease symptoms, displaying preventive and curative protection against apple dieback disease. Strongest disease reduction was observed with *T. simmonsii* A2 (25%) as preventive treatment and with *Bacillus* B2 (33%) applied curatively. Curative disease protection was increased through combination of fungal BCAs A2 and A7, but still below the protective effect of B2 alone. By contrast, combinations including the *Bacillus* isolate B2 led to reduced protection.

For the plant growth parameters (Table 8), we can notice – as in the case of the *P. undulatum* assay – that the application of all BCAs globally helped maintaining growth parameters as for healthy plants (except for the triple combination). Also in this assay, plant growth promotion was observed, especially for shoot length by the treatments highlighted in yellow (Table 8) involving *Bacillus* B2 or *A. westerdijkiae* or the combination of A2 and A7.

Growth promotion studies

As our protection assays suggested that the tested BCAs might have additional plant growth promoting activity, we tested this effect by inoculating the BCAs A2, A7 and B2 without any pathogen on young apple rootstocks. This experiment was conducted by testing the efficiency of the BCA isolates in enhancing and stimulating growth of apple plants and their synergistic or antagonistic interactions, respectively.

The application of the three BCAs significantly increased the root dry biomass of apple plants by 90% (A2) to 108% (A7). Shoot length was increased by 16% (A2) to 29% (A7; Table 9). The *Bacillus* sp. strain B2 led to somewhat lower yields (relative increases: 79% (roots), 25% (shoots)). These data showed that the three tested BCAs have indeed plant growth promoting activities. No significantly further increase was observed with the combinations of BCAs, but lower increases or reduction with some combinations (highlighted in red).

Discussion

The present study focused on the selection of fungal and bacterial BCA isolates for their effective inhibitory activity against *Pythiaceae* isolates causing apple tree dieback, in order to detect new sources to control this important disease in Tunisian apple orchards. Molecular characterization classified the tested fungal isolates as *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. or *Penicillium* spp. These genera are known for their mycoparasitic potential and their capacity to produce secondary metabolites (Gajera et al. 2013; Zhou et al. 2008; Yang et al. 2009; D'ercole et al. 2000; Bhattacharyya and Ja 2011).

According to the anti-*Pythiaceae* activity *in vitro* applying dual culture assays, isolates of *T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A3 and *A. westerdijkiae* A7 showed the most promising *in vitro* inhibition profiles among the tested fungal isolates with respect to inhibition rates and activity spectra.

The genus *Trichoderma* is well known in biocontrol against various fungal and oomycete phytopathogens (Chaverri et al. 2015; Degenkolb et al, 2015; Waghunde et al. 2016; Contreras-Cornejo et al. 2016), although *T. simonsii* has been identified only recently in the composition of commercial biocontrol products previously considered as *T. harzianum* after taxonomy revision of the *T. harzianum* species complex (Chaverri et al., 2015).

Different *Aspergillus* species are considered to be a potential source of secondary metabolites with biomedical importance but also for mycotoxin production (Frisvad et al. 2011); a few are studied for their anti oomycota activity (Getha et al. 2005; Gachomo and Kotchoni 2008), i.e., *A. repens*, *A. niger* and *A. fumigatus* against *Ph. palmivora* (Adebola et Amadi, 2010). However, *A. westerdijkiae* has never been cited as potential BCA. Indeed, *A. westerdijkiae* is known as main ochratoxin A (OTA)-producer, a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin (Vega et al. 2006; Mata et al. 2007; Noonim et al. 2008; Gil-Serna et al. 2009; Gil-Serna et al. 2015; Marino et al. 2009) and of others toxins such as penicillic acids, xanthomegnins or melleins which are considered a potential threat to animal and human health (Fredimoses et al. 2015; Mikkola et al. 2015; Chakraborti and Liang 2016; Han et al. 2016; Frisvad et al. 2004). Therefore, the potential use of our isolate A7 as BCA needs to be carefully analysed, especially with respect to the synthesis of toxic metabolites. It is also important to underline here the observed and significant variations in antagonistic activity between the different *A. westerdijkiae* isolates A7, A10 and A13. They may be attributed to natural diversity among these isolates, as this has been described for OTA production in *A. westerdijkiae* (Sartori et al.

2014), or for other fungal species, particularly in the production of different chemical compounds (Zhou et al. 2008; Eneyskaya et al. 2009; Yang et al. 2009). *A. westerdijkiae* isolate A7 needs to be further analysed for its differential production of secreted molecule(s) with strong anti-oomycete activity.

The tested bacterial isolates, all *Bacillus* spp., led to less pronounced growth inhibition of *Phytophthora* spp. and *Pythium* spp. compared to the fungal BCAs. This is a rather surprising result, as generally *Bacillus* spp. strains have been extensively studied as biocontrol agents effective against soil-borne phytopathogens (Yoshida et al. 2001; Fira et al. 2018; Aloo et al. 2019). Among these species, *B. amyloliquefasciens* isolates were described to significantly inhibit three *Phytophthora* species (Caldeira et al. 2006; Chen et al. 2009; Tan et al. 2013).

One important objective in the present investigation was to explore the *in planta* anti-oomycete activity of different efficient BCA isolates selected from the *in vitro* assays for their protective effect against dieback disease on apple rootstocks *solo* or in combination. We evaluated both, preventive and curative activity of the fungal isolates *T. simmonsii* (A2) and *A. westerdijkiae* (A7) and the *Bacillus* strain (B2). *T. simmonsii* (A2) produced the strongest preventive activity against *Pythium undulatum* (BME) and *Phytophthora inundata* (BGA1) in *solo* application. The combination of different BCAs had contrasting effects. In fact, the combination of the fungal BCAs *T. simmonsii* (A2) and *A. westerdijkiae* (A7) led to increased curative activity on rootstock plants inoculated with *P. undulatum*, compared to both isolates alone. Also, the combination of *Bacillus* strain B2 and *A. westerdijkiae* (A7) revealed a positive interaction when applied preventively. These findings indicate additive or synergistic effects between the two BCAs on disease control. However, the triple combination produced lower protective activity than single applications indicating negative interactions between isolates A2, A7 and B2.

The above precised results strongly indicate that the outcome of BCA combinations in plant protection cannot be easily foreseen and practically employed. Indeed, Xu et al. (2011) who analyzed 465 published treatments found out that only 2% reported probable synergistic effects between BCAs, while in the majority of the cases, antagonistic interactions were observed. However “polymicrobial” approaches have been successfully adopted in several crops to manage plant diseases, because of additive or synergistic interactions between mixed BCA populations to maximize the chances of successful host plant colonization (Guetsky et al. 2001; Guetsky et al. 2002; Whipps 2001; Parnell et al. 2016; De Vrieze et al. 2018; Elad and Stewart 2004; Pertot et al. 2017)

The performance of BCA combinations in the complex ecosystem of the diseased plant may depend on multiple parameters; e.g., the interacting species or isolates, the targeted disease, the host plant, soil composition, weather conditions etc. (Xu et al. 2011). Indeed, the vicinity of other living (micro-) organisms may induce or repress synthesis of secondary metabolites with the desired antipathogenic activity. Some strains of *Pseudomonas* spp. inhibit many soil fungi, including *Trichoderma* spp., due to the production of siderophores, antibiotics or antifungal metabolites (Pan et al. 2010).

Another aspect to consider for BCA efficiency is their impact on plant physiology and growth. Indeed, our study revealed that the three tested BCAs (*T. simmonsii* A2 and *A. westerdijkiae* A7 and the *Bacillus* strain B2) also have plant growth promoting activities on root and shoot, alone or in combination. Such types of effects have been observed before for *Bacillus* spp. (Chowdhury et al., 2013; Idriss et al., 2004). for plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi such as *Trichoderma* spp. (Van Wees et al. 2008; Alfredo and Aleli 2011; Schuster and Schmoll 2010; Vinale et al. 2008; John et al. 2010; Harman et al. 2008; Harman 2011). The interesting finding of our study is the combinatory effect of BCAs on plant growth. As for disease control, the combination worked better with the two fungal partners than with the bacterial strain, strongly suggesting negative interactions between *T. simmonsii* A2, *A. westerdijkiae* A7 and *Bacillus* sp. B2.

Conclusion

The results obtained in the present investigation provide some important new aspects in the highly promising research field of biocontrol agents. Besides the isolation of two new fungal strains as potential BCAs, we showed that their combination may be of particular interest for its curative potential and its beneficial effect on plant growth, while the addition of *Bacillus* B2 should be avoided. This study opens the floor for future studies aiming at the isolation of new molecules with anti-oomycete potential and/or plant growth promoting activity, especially those molecules produced only in combined application. Research is just hitting the top of the iceberg by studying one-by-one parameters of these complex interactions which are important to consider for further practical improvements.

Acknowledgements This research was supported by UR13AGR03, University of Sousse, Tunisia. The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance with Ethical Standards

Disclosure of potential conflicts of interest

Human and animal rights No human and/or animal participants were involved in this research.

Informed consent All authors consent to this submission

References

- Adebola, M.O., & Amadi, J.E. (2010). Antagonistic Activities of *Paecilomyces* and *Rhizopus* Species against the Cocoa Black Pod Pathogen (*Phytophthora palmivora*). *African Scientist*, 4, 235-239.
- Alfredo, M.S., Aleli Cornelia, R.P. (2011). Biological control of sheath blight of upland rice with *Trichoderma* species. *J. Trop. Plant Pathol.*, 69, 1-9.
- Aloo, B. N., Makumba, B. A., and Mbega, E. R. (2019). The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiol. Res.* 219, 26–39.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 108, 386- 395.
- Bacon, C. W., and Hinton, D. M. 2002. “Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species.” *Biol. Contr.* 23(3): 274-84.
- Belen, Suarez., M, Sanz., L., Chanorro, M.I., Rey, M., Gonzalez, F.J., Llobell, A., Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol.*, 11, 924–934.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbial Biotechnol.*, 84(1), 11-18.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2011). Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain TSF 146. *Intern. J. Appl. Biol. Pharm. Tech.*, 2, 133-143.

- Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E., Aslan, E. (2004). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wetttable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Phytopathol.*, 152,471- 475.
- Boughalleb-M'Hamdi, N., Ben Salem, I., and M'Hamdi, M. (2018). Evaluation of the Efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* Species as Biocontrol Agents against Four Soil-borne Fungi of Melon and Watermelon. *Egyptian J. of Biological Pest Control*, 28, 25.
- Caldeira, A.T., Feio, S.S., ArteiroJ, M.S., Roseiro, J.C. (2006). Antimicrobial Activity of Steady-State Cultures of *Bacillus* sp. CCM1 1051 against Wood contaminant fungi. *Biochem. Eng.*, 30(3), 231-6.
- Carbone, I., Kohn, L.M., (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553–556.
- Cardona, R., Rodriguez, H. (2006). Effect of *Trichoderma harzianum* fungus on the incidence of the charcoal rot disease on sesame. *Rev Facultad Agron. LUZ.* 23, 42-47.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011). *Bacillus* based biological control of plant diseases. In: Stoytcheva M(Ed), Pesticides in the modern world—pesticides use and management (pp. 273–302). InTech, Rijeka.
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J., Vicente, A.d., Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Applied Microbiol.*, 103, 1950-1959.
- Chakraborti, A., Li, J., and Liang, Z.X. (2016). Complete Genome Sequence of the Filamentous Fungus *Aspergillus westerdijikiae* reveals the putative biosynthetic gene cluster of ochratoxin A. *Genome announcements* 4, 4(5), 00982-16. doi:10.1128/genome A.00982-16.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. J., (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*,107(3), 558–590.
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Piel, J., Borriss, R. (2009). Genome Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Reveals Its Potential for Biocontrol of Plant Pathogens. *J. Biotechnol.*, 140(1-2), 27-37.
- Chowdhury, S.P., Kristin, D., Randler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and

- Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. PLoS ONE, 8(7): e68818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068818>.
- Christopher, D.J., Suthin Raj, T., Usha Rani, S., Udhayakumar, R. (2010). Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium wilt* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, *Journal of Biopesticides*, 3(1), 158-162.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol*, 92(4).
- Degenkolb, T., Fog Nielsen, K., Dieckmann, R., Branco-Rocha, F., Chaverri, P., Samuels, G.J., Thrane, U., Von Döhren, H., Vilcinskas, A., Brückner, H. (2015). Peptaibol, Secondary-Metabolite, and Hydrophobin Pattern of Commercial Biocontrol Agents Formulated with Species of the *Trichoderma harzianum* Complex. *Chemistry & biodiversity*, 12.
- D'Ercole, N., Nipoti, P., Di Pillo, L., Gavina, F. (2000). In vitro and *in vivo* tests of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent of *Verticillium dahliae* Kleb in eggplants. In: Tjamos EC, Rome RC, Heale JB, Fravel DR (EDs) *Advances in Verticillium: Research and Disease Management* (pp. 260-263). APS Press, St Paul, MN USA.
- De Vrieze, M., Germanier, F., Vuille, N., & Weisskopf, L. (2018). Combining Different Potato-associated *Pseudomonas* Strains for Improved Biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Front. Microbiol*, 9, 2573.
- Dooley, S.R., Beckstead, J. (2010). Characterizing the interaction between a fungal seed pathogen and a deleterious rhizobacterium for biological control of cheatgrass. *Biol. Control*, 53, 197-203.
- Dunn, A. R., Milgroom, M. G., Meitz, J. C., McLeod, A., Fry, W. E., McGrath, M. T., Dillard, H. R., & Smart, C. D. 2010. Population structure and resistance to mefenoxam of *Phytophthora capsici* in New York State. *Plant Di.*, 94, 1461-1468.
- Elad, Y. (2000). *Trichoderma harzianum* T39 Preparation for Biocontrol of Plant Diseases- Control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(4), 499-507.
- Elad, Y., Freeman, S. (2002). Biological control of fungal plant pathogens. In *The Mycota XI: Agricultural Applications* (pp. 93-109). Berlin: Springer-Verlag.

- Elad, Y., Stewart, A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, (EDs). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Elliott, M., Shamoun, S.F., Sumampong, G., James, D., Masri, S., Varga, A. (2009). Evaluation of several commercial biocontrol products on European and North American populations of *Phytophthora ramorum*. *Biocontrol Sci. Technol.*, *19*, 1007-1021.
- Eneyskaya, E.V., Sundqvist, G., Golubev, A.M., Ibatullin, F.M., Ivanen, D.R., Shablin, K.A., Brumer, H., Kulminsskaya, A.A. (2009). Transglycosylating and hydrolytic activities of the β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochimie*, *91*, 632-638.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H. (2003). Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology*, *93*, 229-235.
- Fira, D., Dimkic, I., Beric, T., Lozo, J., and Stankovic, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol*, *285*, 44–55.
- Fredimoses, M., Zhou, X., Ai, W., Tian, X., Yang, B., Lin, X., Xian, J.Y., & Liu, Y. (2015). Westerdijkia A, a new hydroxyphenylacetic acid derivative from deep sea fungus *Aspergillus westerdijkiae* SCSIO 05233. *Natural product research*, *29*, 158-162.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O, Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R.A, et al. (2011). Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *PLOS ONE*, *6*(8), e23496.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O.,& Samson RA. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. *Studies in Mycology*, *49*, 201-241.
- Gachomo, E.W., Kotchoni, S.O. (2008). The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential biocontrol agents against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. *Biotechnology*, *7*, 439–447.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Current research in Microbiology and Biotechnology*, *4*(1), 133-142.
- Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W.H., Seki, T., Ward, A., Goodfellow, M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot grown banana plantlets. *J. of Microbiology and Biotechnology*, *32*(1), 24–32.

- Gil-Serna, J., Vazquez, C., Sardinas, N., Gonzalez-Jaen, M.T., and Patino, B. (2009). Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section Circumdati by specific PCR assays. *International journal of food microbiology*, 136, 83-87.
- Gil-Serna, J., Patino, B., Cortes, L., Gonzalez-Jaen, M.T., and Vazquez, C. (2015). *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food microbiology* 46, 168-175.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinooor, A. (2001). Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91, 621-627.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., and Dinooor, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92, 976-985.
- Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M.R., Davari, M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in control of soil borne plant pathogenic fungi. *Afr. J. Biotechnol*, 7(8), 967-972.
- Han, T., You, C., Zhang, L., Feng, C., Zhang, C., Wang, J., Kong, F. (2016). Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *Biocontrol*, 61(2), 195–205.
- Harman, G.E., Bjokman, T., Ondik, K., Shores, M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on Pest Management*, 19, 24–29.
- Harman, G.E. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist*, 189, 647–649.
- Hu, J. H., Honga, C. X., Stromberg, E. L., & Moorman G.W. (2008). Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA *Plant Pathology*, 57, 728–736.
- Idris, E.E., Bochow, H., Ross, H., Borriss, R. (2004). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111 (6), 583–597.
- Jaklitsch, W.M., Voglmayr, H. (2012). *Hypocrea brittdaniae* and *H. foliicola*: two remarkable new European species. *Mycologia*, 105, 1213–1221.
- Janousek, C.N., Lorber, J.D., Gubler, W.D. (2009). Combination and rotation of bacterial antagonists to control powdery mildew on pumpkin. *J. Plant Dis. Prot.*, 116, 260-262.

- John, R.P., Tyagi, R.D., Prévost, D., Brar, S.K., Pouleur, S., Surampalli, R.Y. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29, 1452–1459.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94, 1259–1266.
- Larousse, M., & Galiana E (2017). Microbial partnerships of pathogenic Oomycetes. *PLOS Pathog*, 13(1): e1006028.
- Le Floch, G., Vallance, J., Benhamou, N., Rey, P. (2009). Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: Root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol. Control*, 50, 288-298.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol*, 63, 541–55.
- Mahmood, A., Oweis, T., Ashraf, M., Majid, A., Aftab, M., Aadal, N.K., Ahmad, I. (2015). Performance of improved practices in farmers' fields under rainfed and supplemental irrigation systems in a semi-arid area of Pakistan. *Agricultural Water Management*, 155, 1–10.
- Maisuria, K.M., Patel, S.T. (2009). Seed germinability, root and shoot length and vigour index of soybean as influenced by rhizosphere fungi. *Karnataka Journal Agricultural Science*, 22, 1120-1122.
- Manceau, C., Horvais, A. (1997). Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. tomato. *Applied and environmental microbiology*, 63(2), 498-505.
- Marino, A., Nostro, A., and Fiorentino, C. (2009). Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *International journal of food microbiology*, 132, 185-189.
- Mata, M.M., Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T., Sartori, D., Oliveira, A.L., Furlaneto, M.C., and Fungaro, M.H. (2007). Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. *Canadian journal of microbiology*, 53, 148-151.
- Meraj-ul, H., Nandkar, P.B. (2012). Antagonistic effect of rhizospheric *Trichoderma* isolates against tomato damping-off pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Intl. J. Res. BioSci.*, 1(2), 27-31.

- Mikkola, R., Andersson, M.A., Hautaniemi, M., and Salkinoja-Salonen, M.S. (2015). Toxic indole alkaloids avrainvillamide and stephacidin B produced by a biocide tolerant indoor mold *Aspergillus westerdijkae*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 99, 58-67.
- Mpika, J., Kébé, I.B., Issali, A.E., N'guessan, F.K., Druzhinina, S., Komon-Zélazowska, M., Aké, S. (2009). Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palminora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology*, 8, 5280-5293.
- Nadeem, S.M., Naveed, M., Ahmad, M., Zahir, Z.A. (2015). *In: Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. In: Naveen Kumar Arora (Eds.), (pp. 1-36) London: Springer.
- Nicot, P.C., Stewart, A., Bardin, M., Elad, Y. (2016). Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis-Induced Diseases. *In: Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. S. Fillinger & Y. Elad (Ed.) (pp. 165-187). Cham: Springer International Publishing.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International journal of food microbiology*, 128, 197-202.
- Pan, S., Jash, S. (2010). Variability in biocontrol potential and microbial interaction of *Trichoderma* spp. with soil inhabiting antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Indian Phytopath*, 63, 158-164.
- Parnell, J.J, Berka, R., Young, H.A., Sturino, J.M., Kang, Y., Barnhart, D.M., & DiLeo, M.V. (2016). From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Front. Plant Sci.*, 7, 1110. doi: 10.3389/fpls.2016.01110.
- Parra, G., and Ristaino, J. B. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Dis*, 85(10), 1069-1075.
- Pertot, I., Giovanninia, O., Benanchib, M., Caffic, T., Rossic, V., Mugnaib, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop protection*, 97: 85-93.

- Pscheidt, J.W. (2019). Diagnosis and Control of *Phytophthora* Diseases. IN Pscheidt, J.W., and Ocamb, C.M. (Senior Eds.), Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook (pp. 383)
- Punja, Z.K., Utkhede, R.S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.*, 21, 400-407.
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernandez-Galan, R., Collado, I.G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem*, 7, 89–123.
- Rippa, S., Eid, M., Formaggio, F., Toniolo, C. & Be' ven, L. (2010). Hypersensitive-like response to the pore-former peptaibol alamethicin in *Arabidopsis thaliana*. *ChemBioChem*, 11, 2042–2049.
- Sadfi-Zouaoui, N.B., Essghaier, M.R., Hajlaoui, M.L., Fardeau, M.L., Cayaol, J., Ollivier, B. (2008). Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology*, 156, 42–52.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173.
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.H., Clement, C., Baillieul, F., Dorey S. (2012), Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol*, 160(3), 1630-1641.
- Sartori, D., Massi, F.P., Ferranti, L.S., & Fungaro, M.H. (2014). Identification of Genes Differentially Expressed Between ochratoxin-producing and Non-producing Strains of *Aspergillus westerdijkiae*. *Indian journal of microbiology*, 54, 41- 45.
- Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 87, 787-799.
- Shi, L., Du, N.S., Yuan, Y.H., Shu, S., Sun, J., Guo, S.R. (2016). Vinegar residue compost as a growth substrate enhances cucumber resistance against the *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* by regulating physiological and biochemical responses *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1-11.
- Singh, H.B. (2014). Management of plant pathogens with microorganisms. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 80, 443-454.

- Souli, M, Boughalleb N, Abad-Campos P, Armando L, Á lvarez L, Pérez-Sierra A, Armengol J, García-Jiménez J (2010). First Report of *Pythium indigoferae* and *P. irregulare* Associated to Apple Trees Decline in Tunisia. *Journal of Phytopathology*, 159(5), 352-357.
- Souli, M., Abad-Campus, P., Pérez-Sierra, A., Fattouch, S., Armengol, J., Boughalleb-M'Hamdi, N. (2014). Etiology of apple tree dieback in Tunisia and abiotic factors associated with the disease. *African journal of microbiology research*, 8(23), 2272-2281.
- Souli, M. (2016). Caractérisation morphologique, moléculaire et phylogénique des pythiacées affectant le pommier, recherche des approches de lutte et étude des réactions de défense. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques. Institut Supérieur Agronomiques de chott Mariem, Sousse, Tunisie, 181 pp.
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., Samiyappan, R. (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *J. Biol. Control*, 60, 59-67.
- Tan, S.Y., Jiang, Y., Song, S., Huang, J.F., Ling, N., Xu, Y.C., Shen, Q.R. (2013). Two *Bacillus amyloliquefaciens* Strains Isolated Using the Competitive Tomato Root Enrichment Method and Their Effects on Suppressing *Ralstonia solanacearum* and Promoting Tomato Plant Growth. *Crop Protec.*, 43, 134 - 40.
- Vakalounakis, D.J., Fragkiadakis, G.A. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compability and RAPD fingerprinting. *Phytopathology*, 89, 161-168.
- Van Wees, S.C.M., Van der Ent, S., Pieterse, C.M.J. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11, 443–448.
- Vega, F.E., Posada, F., Gianfagna, T.J., Chaves, F.C., and Peterson, S.W. (2006). An insect parasitoid carrying an ochratoxin producing fungus. *Die Naturwissenschaften*, 93, 297-299.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 80-86.
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycoogy*, 78, 343-371.

- Waghunde, R.R., Shelake, R.M., & Sabalpara, A.N. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agriculture research*, 11(22), 1952-1965.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- White, T.J., Bruns, T., Leen, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA (pp. 315–322).
- Xu, XM., Robinson, J.D., Jeger, M., Jeffries, P. (2010). Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. *Biocontrol Sci. Technol.*, 20, 359-373.
- Xu, XM., Jefferies, P., Pautasso, M., Jeger, M.j. (2011). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. exp. Bot.*, 52, 487-511.
- Yang, D., Wang, B., Wang, J., Chen, Y., Mingguo, Z. (2009). Activity and efficacy *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and sclerotinia stem rot of rape. *J. Biol Control*, 51, 61-65.
- Yedidiaa, I., Benhamoub, N., Kapulnikc, Y., Cheta, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physio. and Biochemistry*, 38(11), 863-873.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefacien* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91, 181-7.
- Zhou, J., Wang, Y.H., Chu, J., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L., Yin, P. (2008). Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of 474 *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresour. Technol.*, 99, 6826-6833.

Table 1 Details of the *Pythiaceous* species used in *in vitro* test

Species	Code	Plant part	Geographic origin	Year of isolation
<i>Pythium undulatum</i>	BME	Collar	Kasserine	2007
<i>Pythium sterillum</i>	KF403	Roots	Bizerte	2007
<i>Pythium irregulare</i>	KS18S	Roots	Kasserine	2009
<i>Pythium indigoferae</i>	B18	Roots	Ben Arous	2009
<i>Phytophthora inundata</i>	BGA1	Roots	Bizerte	2009
<i>Phytophthora citrophthora</i>	BGO2	Roots	Bizerte	2009

Table 2 Details of the *antagonistic fungal* species used in the study

Codes	Identified species	Origin	Year of isolation
A1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Soil sample	2014
A2	<i>Trichoderma simmonsii</i>	Melon	2014
A3	<i>Trichoderma asperellum</i>	Soil sample	2014
A4	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	melon	2014
A5	<i>Aspergillus</i> sp	Soil sample CH Mariem	2014
A6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Soil sample CH Mariem	2014
A7	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Soil sample	2009
A8	<i>Penicillium</i> sp	Soil sample	2009
A9	<i>Penicillium</i> sp.	Soil sample	2009
A10	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Soil sample CH Mariem	2009
A11	<i>Aspergillus</i> sp.	Soil sample CH Mariem	2009
A12	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Soil sample CH Mariem	2009
A13	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Soil sample CH Mariem	2009

Table 3 Details of the *antagonistic Bacterial* strains used in the study

Codes	Identified species	Origin: Tomato plant	Year of isolation	Geographic origin
B1	<i>Bacillus</i> sp.	Stem	2010	Sfax
B2	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B3	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B4	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax
B5	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax
B6	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B7	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax
B8	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B9	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B10	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax
B11	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax
B12	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax
B13	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B14	<i>Bacillus</i> sp.	collar	2010	Sfax
B15	<i>Bacillus</i> sp.	Roots	2010	Sfax

Table 4 Primers used for amplification and sequencing

Locus	Primer name	Direction	Primer sequence (5'-3')	References
Internal Transcribed Spacer (ITS)	ITS1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. (1990)
	ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
β-tubulin (BenA)	Bt2a	Forward	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Visagie et al. (2014)
	Bt2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Visagie et al. (2014)
Calmodulin (CaM)	CMD5	Forward	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Samson et al. (2014)
	CMD6	Reverse	CCGATR GAG GTC ATR ACGTGG	Samson et al. (2014)
EF1-α gene	EF1-728	Forward	CAT CGA GAAGTTCGAGAAGG	Carbone and Kohn (1999)
	Tef1LLE	Reverse	AACTTGCAGGCAATGTGG	Jaklitsch and Voglmayr (2015)
16SrRNA	A1	Forward	GAG TTT GAT CAT GGC TCA G	Manceau and Horvais (1997)
	B6	Reverse	TTG CGG GAC TTA ACC CAA CAT	Manceau and Horvais (1997)

Table 5 *In vitro* growth inhibition activity of fungal BCA's against *Phytophthora* spp. and *Pythium* spp. in dual culture tests

BCA	Mycelial growth inhibition (%)					
	<i>Phytophthora inundata</i> BGA1	<i>Phytophthora citrophthora</i> BG02	<i>Pythium sterillum</i> KF403	<i>Pythium undulatum</i> BME	<i>Pythium indigoferae</i> B18	<i>Pythium irregulare</i> KS18S
A1	49.02 ± 1.12 c	52.55±1.22 cd	35.41±1.12 de	53.33± 0.99 bc	45.10± 1.21cde	45.10± 1.17 cde
A2	52.94 ± 1.20 bc	60.78± 1.23 a	53.73±1.20 abc	54.12± 1.22 bc	52.15±1.30 abc	52.15± 1.21 bc
A3	46.66 ± 1.17 cd	60.78± 1.36 a	46.36±1.19 bcd	66.67± 1.13 a	49.41±1.30 abcd	51.37± 1.14 bc
A4	58.04 ± 1.23 b	49.02±1.36 de	60.38±1.21ab	67.06± 1.29 a	54.51±1.17 abc	52.94± 1.27 b
A5	41.96± 1.03de	36.47± 1.06 h	46.80± 1.08 bcd	40.39± 1.13 e	38.03± 1.01 e	42.35± 1.08 de
A6	41.17 ± 1.18de	39.21± 1.14 gh	33.29± 1.07 de	46.66± 0.96 d	50.59±1.04 abcd	41.17± 1.07 ef
A7	52.94 ± 1.12 bc	49.41± 1.12 de	64.60± 1.17 a	45.10± 1.34 de	45.49± 1.17 cde	49.02± 1.21 bcd
A8	47.06 ± 1.26 cd	47.45±1.06 def	29.62± 0.99 ef	40.17± 0.86 e	52.81± 1.15 a	35.11± 1.14 fg
A9	53.33 ± 1.24bc	60± 1.20 ab	59.40±1.35ab	52.12± 1.28 c	55.68± 1.29 ab	66.53± 1.22 a
A10	49.02 ± 1.26 c	54.9± 1.26 bc	41.11±1.30 cde	57.88± 1.04 b	58.07± 1.23 a	61.20± 1.17 a
A11	47.45 ± 1.07 cd	46.27± 1.11 ef	32.17± 0.93 de	44.30± 0.93 de	41.50± 1.13 de	30.96± 1.15 g
A12	39.61± 1.03e	42.74± 0.97 fg	17.30± 0.82 f	33.92± 0.69 f	38.18± 1.09 e	24.01± 1.05 h
A13	67.84 ± 1.14 a	55.68±1.13abc	62.06± 1.36 a	45.10± 1.30 d	47± 1.24 bcde	66.97± 1.37 a

*Mycelial growth inhibition percentage values, means ± standard deviation (number of replicates n=6). Duncan multiple range test: values followed by different letters are significantly different at p≤0.05.

**Duncan is for comparison of means among fungal antagonists with the same pathogen on mycelial growth inhibition.

Color code for highlighting is: yellow = inhibition rate >50%, orange = inhibition rate >60%

Table 6 *In vitro* growth inhibition activity of bacterial BCAs against *Phytophthora spp* and *Pythium spp*. in dual culture tests

BCA bacteria	Mycelial growth inhibition (%)					
	<i>Phytophthora inundata</i> BGA1	<i>Phytophthora citrophthora</i> BG02	<i>Pythium sterillum</i> KF403	<i>Pythium undula- tum</i> BME	<i>Pythium indigo- ferae</i> B18	<i>Pythium irregulare</i> KS18S
B1	31.37 ± 0.93 a	25.88 ± 0.85 bc	22.79 ± 0.77 cd	11.79± 0.58 hi	11.19± 0.55 f	11.37± 0.56 efg
B2	28.23 ± 0.88 ab	14.12 ± 0.62 de	30.38 ± 0.92 b	18.38 ± 0.71 def	18.55± 0.72de	16.86 ± 0.68 cd
B3	10.19 ± 0.53 e	14.51 ± 0.63 de	29.11± 0.92 bc	11.13± 0.58 i	9.87 ± 0.52 f	8.62± 0.49 fg
B4	9.02 ± 0.49 e	27.84 ± 0.88 b	8.94 ± 0.48 i	31.46 ± 0.91 a	33.07± 0.96 a	29.02± 0.90 a
B5	19.21 ± 0.73 cd	7.45 ± 0.4 f	20.82 ± 0.76 def	17.38± 0.56 defg	23.52± 0.81 bc	20.00± 0.74 bc
B6	7.45 ± 0.45 e	24.70 ± 0.83 bc	21.21± 0.76 de	26.55 ± 0.88 b	25.20 ± 0.83b	29.80± 0.90a
B7	10.59 ± 0.54 e	21.17 ± 0.76 c	29.49± 0.90 bc	20.27 ± 0.72 cdef	21.55± 0.77 bcd	16.08± 0.66 cd
B8	9.80 ± 0.52e	38.82 ± 1.03 a	13.51 ± 0.61fghi	30.77± 1.01 a	24.34 ± 0.82 bc	17.65± 0.69 bc
B9	23.53 ± 0.80 bc	16.08 ± 0.66 d	18.34± 0.70 defg	20.01± 0.72 cdef	21.43± 0.77 bcd	21.57± 0.77 b
B10	9.80 ± 0.52 e	10.59 ± 0.53 ef	13.10 ± 0.60 ghi	13.53± 0.65 ghi	11.57± 0.55 f	7.84± 0.46 g
B11	12.16± 0.58 de	24.70 ± 0.82 bc	17.19± 0.69 efg	21.53± 0.79 cd	20.58± 0.75bcde	12.55± 0.58 def
B12	14.90± 0.64 de	25.10 ± 0.83 bc	9.39 ± 0.51 hi	24.21± 0.87 bc	19.74± 0.73 cde	28.23± 0.88 a
B13	12.94 ± 0.58 de	15.30 ± 0.65 de	14.30± 0.62efghi	16.57± 0.69 efg	16.09± 0.67 e	16.47 ± 0.67 cd
B14	10.59 ± 0.54 e	24.31 ± 0.81 bc	16.36± 0.67defgh	16.57± 0.77 fgh	10.71± 0.52 f	15.29± 0.65cde
B15	29.02 ± 0.86 ab	11.76 ± 0.56 def	37.01± 1.00 a	20.90± 0.80 cde	18.55 ± 0.72 de	21.57± 0.77 b

*Mycelial growth inhibition percentage, means ± standard deviation (number of replicates n=6)

Duncan multiple range test: values followed by different letters are significantly different at p≤0.05.

**Duncan is for comparison of means among fungal antagonists with the same pathogen on mycelial growth inhibition.

Color code for highlighting is yellow inhibition rate >25%

Table 7 Effect of BCA's on the control of dieback disease caused by *Pythium undulatum* (BME) measured twelve weeks post infection

Treatments	Disease severity%		Growth parameters			
	Preventive	Curative	Shoot length (cm)		Root dry biomass (g)	
			Preventive	Curative	Preventive	Curative
(-) control (healthy)	0 ± 0 g	0 ± 0 f	24.08 ± 0.41b	24.08 ± 0.41 bcd	1.27 ± 0.09 bcd	1.27 ± 0.09 bc
(+) control (BME alone)	52.77 ± 0.60c	66.66 ± 0.68 b	19.08 ± 0.36 c	20.58 ± 0.38 d	1.2 ± 0.09 cd	0.91 ± 0.09 c
BME+A2	33.33 ± 0.48e	58.88 ± 0.64 d	25.91 ± 0.42 b	25.83 ± 0.42 abc	1.62 ± 0.10 abc	1.56 ± 0.10 b
BME+A7	41.66 ± 0.54 d	62.50 ± 0.66 c	26.25 ± 0.42 b	27.83 ± 0.44 ab	1.81 ± 0.11ab	1.76 ± 0.11 b
BME+B2	62.5 ± 0.66 b	66.66 ± 0.68 b	27.66 ± 0.44 ab	29 ± 0.45 a	1.35 ± 0.09 bcd	2.34 ± 0.11 a
BME+ A2 + A7	41.66± 0.54 d	38.88 ± 0.52 e	30.33 ± 0.46 a	28.25 ± 0.44 ab	2.15 ± 0.12 a	2.50 ± 0.09 a
BME+ A7+ B2	29.16± 0.45 f	62.50 ± 0.66 c	30.33 ± 0.46 a	23.41 ± 0.40 cd	1.93 ± 0.11 a	1.33 ± 0.07 bc
BME+ A2 +A7+ B2	66.66 ± 0.68 a	75 ± 0.72 a	24.08 ± 0.40 b	22.50 ± 0.39 cd	0.79 ± 0.07d	1.52 ± 0.08 b

Disease severity (%), shoot length (cm) and root dry biomass (g) represented by the mean value of 3 replicates with 4 plants/replicate (n=12) ± standard deviation. BCA treatments were applied one week before the pathogen (preventive) or one week after the pathogen (curative) as described in materials and methods

Duncan multiple range test: values followed by different letters are significantly different at p≤0.05.

Color code: green = synergy; red = antagonism; yellow = plant growth stimulation (significant at p≤0.05).

Table 8 Effect of BCA's on the control of dieback disease caused by *Phytophthora inundata* (BGA1) measured twelve weeks post infection

Treatments	Disease severity (%)		Growth parameters			
	Preventive	Curative	Shoot length (cm)		Root dry weight (g)	
			Preventive	Curative	Preventive	Curative
(-) control (healthy)	0 ± 0 f	0 ± 0 h	24.08 ± 0.41 c	24.08± 0.41 c	1.27± 0.09 bc	1.27 ± 0.09 bc
(+) control (BGA1 alone)	70.83 ± 0.71 a	79.16 ± 0.74 a	23.66 ± 0.40 c	23.58 ± 0.40 c	0.91± 0.08 c	0.96± 0.08 d
BGA1+A2	25± 0.42 e	50± 0.59 d	26.25 ± 0.42 bc	27.83 ± 0.44 ab	1.55± 0.1 b	1.20± 0.09 cd
BGA1+A7	45.83± 0.56 c	42.35± 0.54 e	29.42 ± 0.45 ab	28 ± 0.44 ab	1.76 ± 0.1 b	2.85± 0.14 a
BGA1+B2	41.66± 0.54 d	33.33 ± 0.48 g	33.04 ± 0.48 a	29 ± 0.45 ab	2.34 ± 0.12 a	1.71 ± 0.11 bc
BGA1+A2 +A7	41.66 ± 0.54 d	37.50± 0.51 f	32.25 ± 0.47 a	31.08 ± 0.46 a	2.50± 0.13 a	2.12± 0.12 b
BGA1+A7 + B2	41.66 ± 0.54 d	75 ± 0.72 b	29.33 ± 0.44 ab	25.50± 0.42 bc	1.33 ± 0.09 bc	1.33± 0.09 cd
BGA1+A2+ A7+B2	61.11± 0.65 b	69.44 ± 0.69 c	23.33 ± 0.40 c	16.83± 0.34 d	1.52± 0.10 b	1.18 ± 0.09 cd

Disease severity (%), shoot length (cm) and root dry weight (g) represented by the mean value of 3 replicates with 4 plants/replicate (n=12) ± standard deviation.

BCA treatments were applied one week before the pathogen (preventive) or one week after the pathogen (curative) as described in materials and methods;

Duncan multiple range test: values followed by different letters are significantly different at p≤0.05.

Color code: green = synergy, red = antagonism, yellow = plant growth stimulation (significant at p≤0.05).

Table 9 Evaluation of biocontrol isolates of *T. simmonsii*, *A. westerdijkiae* and *Bacillus* sp. to stimulate growth of apple rootstocks

Growth parameters		
Treatments	Shoot length (cm)	Root dry biomass (g)
(-) control	24.08± 1.41 d	1.27± 0.31c
A2	27.83± 0.70 c	2.15± 0.42 ab
A7	30.83± 1.60 ab	2.64± 0.46a
B2	29.75± 1.57 b	2.27± 0.43a
A2+A7	31.58± 1.62 a	2.21± 0.41ab
A7+B2	27.00± 1.49 c	2.09± 0.40 ab
A2+A7+B2	15.75± 1.14 e	1.51± 0.34 bc

Each value represents the mean of 3 replicates with four plants each (n=12) ± standard error of the mean (SEM). Values with the same letter do not differ significantly (p<0.05). The values with treatments were compared to negative control (healthy plants)
 Color code: red = antagonism (significant at p≤0.05).

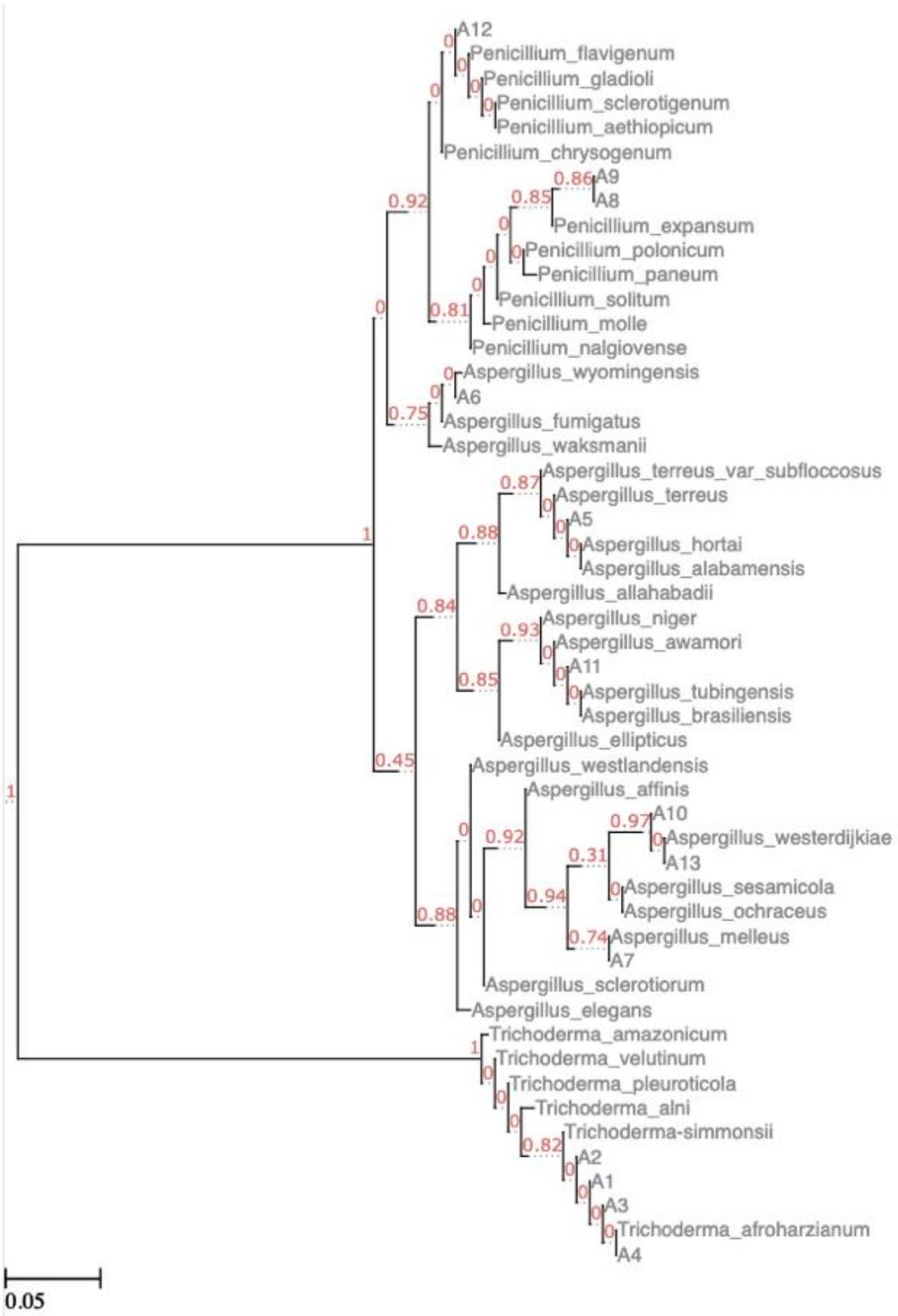


Fig S1. Genus identification from ITS sequences

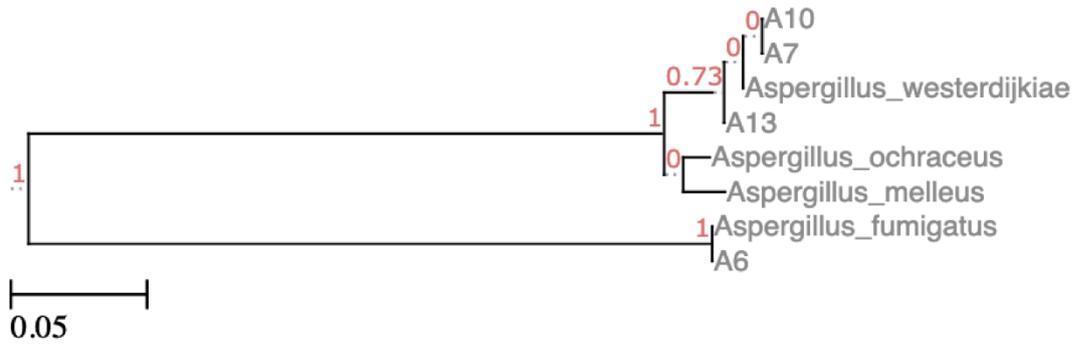


Fig S2. Phylogenetic tree for *Aspergilli*

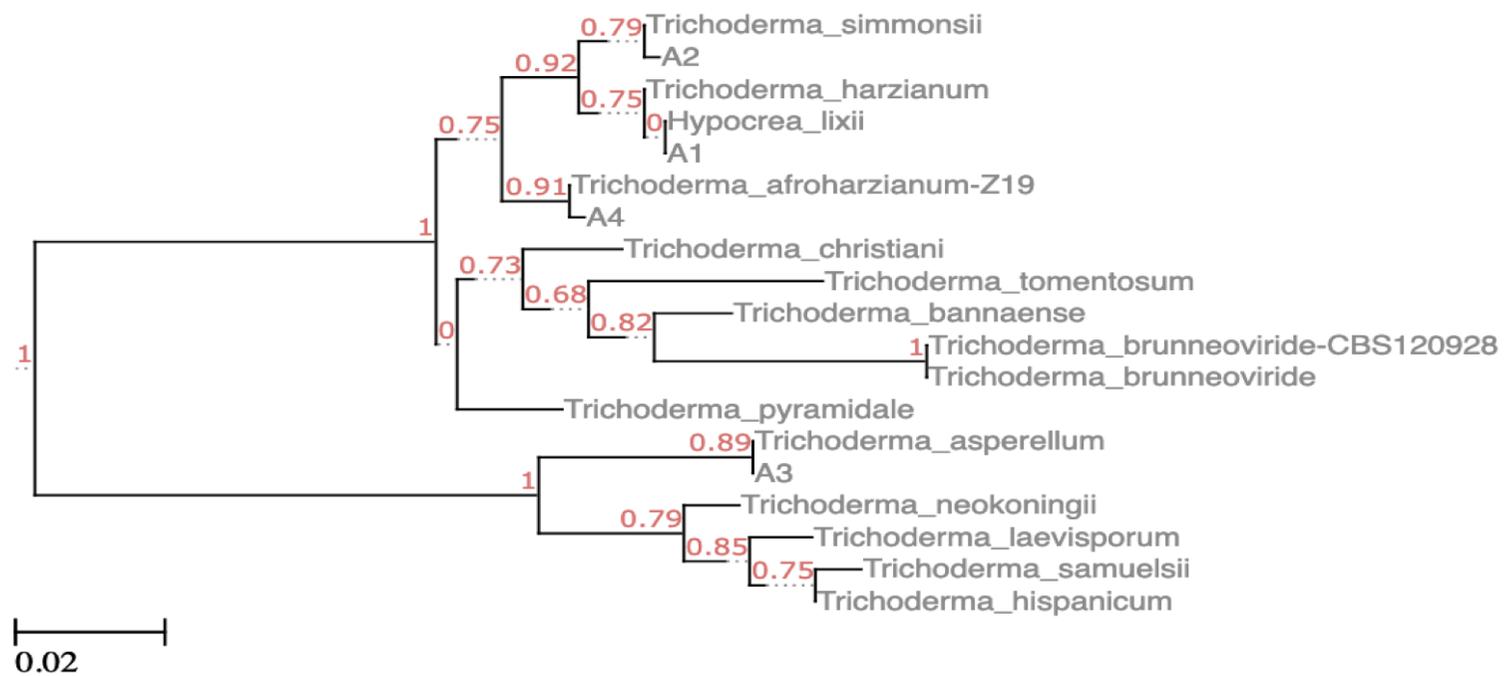


Fig S3. Phylogenetic tree of *Trichoderma* spp.

Chapitre III

Purification et caractérisation chimique de la molécule anti-Pythiacées produites par l'isolat *Aspergillus westerdijkiae* A7

Introduction

Dans l'objectif de sélectionner les meilleurs candidats agissant par antibiose, l'activité anti-Pythiacées des filtrats de culture des isolats fongiques *Trichoderma simmonsii* A2, *Trichoderma asperellum* A3, *Trichoderma afroharzianum* A4, *Penicillium* sp. A9 et deux isolats *Aspergillus westerdijkiae* (A7 et A13) a été testée comme décrit dans le chapitre II. Les filtrats de culture des isolats *T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A3 et *A. westerdijkiae* A7 ayant produit les taux d'inhibition de la croissance mycélienne les plus importants contre les isolats de la famille des Pythiacées, ont été retenus pour une caractérisation approfondie. Cette étude a été réalisée dans le but de définir les conditions de production optimales des molécules anti-Pythiacées puis de les identifier.

Notre choix initial de sélectionner plusieurs isolats de *Trichoderma* spp a été basé sur le rôle important du genre *Trichoderma*. En effet, *Trichoderma* spp sont utilisées comme des BCAs contre une large gamme d'agents phytopathogènes y compris les champignons, les bactéries, les oomycètes et les virus, révélé par de nombreuses études et résumé dans la partie I de cette thèse (Harman et al. 2004; Pal et Gardener, 2006; Woo et al. 2014; Marcello et al., 2010; Wu et al., 2017; Boughalleb-M'Hamdi et al., 2018; Mougou et Boughalleb-M'Hamdi, 2018). Grâce à leur fort pouvoir d'adaptation à différentes niches écologiques, le métabolisme de *Trichoderma* spp est remarquablement diversifié. Ainsi elles ont un fort potentiel pour le développement de solutions alternatives à la lutte chimique en exprimant de nombreuses enzymes et éliciteurs. Elles sont connues en tant que producteurs d'une variété de métabolites secondaires (MS) de natures diverses ayant des effets bénéfiques pour les plantes (Vinale et al., 2014). Des études de génomes d'isolats de *Trichoderma* spp ont révélé l'existence de nombreux clusters de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire (MS) dont les molécules produites et leur activité reste à élucider (Reino et al., 2008 ; Vinale et al., 2014). Ajouté à cela les *Trichoderma* spp possèdent plusieurs caractéristiques les rendant intéressants en tant qu'agents de biocontrôle. Il s'agit de :

- Leur nature avirulente et symbiotique.
- Leur capacité à stimuler les mécanismes de défenses aux stress abiotiques et aux agents pathogènes chez les plantes.
- Leur rôle de biofertilisants et de leur capacité de promouvoir la croissance des plantes (PGP)

- Leur capacité de compétition dans l'écosystème (Kubicek et *al.* 2011 ; Monfil et Casas-Flores 2014 ; Vinale et *al.*, 2008; Shores et *al.*, 2010).

La recherche de nouveaux métabolites secondaires produits par les espèces de *Trichoderma* reste toujours très intéressante, étant donné que la production des métabolites secondaires varie selon les conditions de culture ainsi que l'isolat phytopathogène cible. Les espèces *Trichoderma simmonsii* et *Trichoderma asperellum* sont moins étudiées en tant que BCAs vis-à-vis des oomycètes, ce qui nous a incités à sélectionner ces deux isolats fongiques pour une caractérisation approfondie.

Notre choix de retenir l'isolat *A. westerdijkiae* A7 a été principalement basé sur l'important taux d'inhibition par son filtrat de culture vis-à-vis des isolats de la famille des *Pythiacées* testés. Par ailleurs, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme une source potentielle de métabolites secondaires. Certaines espèces du genre *Aspergillus* dont *A. repens*, *A. niger* et *A. fumigatus* ont été étudiées pour leur activité anti-oomycota contre *Ph. palmivora* (Adebola et Amadi, 2010). En dehors de ces raisons, il est intéressant d'étudier cet isolat puisque *A. westerdijkiae* n'a jamais été cité comme BCA. Il est cependant important de souligner que ce choix présentait aussi un risque puisque certaines espèces d'*Aspergillus* dont *A. westerdijkiae* sont connues principalement pour leur production de mycotoxines, d'ochratoxine A (OTA), d'acide pénicillique, de xanthoménines ou de melleins (Frisvad et *al.* 2011; Mikkola et *al.*, 2015; Chakraborti et Liang, 2016).

Dans ce chapitre, nous décrivons la démarche employée pour sélectionner le meilleur candidat agissant par antibiose et ayant la plus forte activité anti-Pythiacées dont l'objectif est d'identifier la ou les molécules active(s) responsables de cette activité. Identifier les molécules à activité anti-Pythiacées nous permettra par la suite d'évaluer la toxicité non-cible de la molécule et, par conséquent, du BCA. La molécule pourrait également servir de molécule "guide" pour le dessin de nouvelles molécules anti-oomycètes.

Pour cela nous avons étudié de la cinétique de production des métabolites bioactifs en fonction de la durée d'incubation afin de sélectionner le ou les isolat(s) fongique(s) le(s) plus efficace(s). Une fois l'isolat le plus efficace et les conditions de production optimales identifiées, nous avons entrepris la purification et la caractérisation chimique des principaux composés actifs. Les paragraphes suivants relatent cette étude.

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique et conditions de culture

Les isolats *T. simmonsii* (A2), *T. asperellum* (A3) et *A. westerdijkiae* (A7) décrits dans le chapitre II ont été utilisés pour cette étude. Pour la production des métabolites non-volatiles à activité anti-oomycète, ces isolats ont été cultivés à une température de 26°C dans du milieu liquide PDB (Potato-Dextrose-Broth, Difco). Le maintien de ces isolats a été fait sur du PDA (Potato-Dextrose-Agar, Difco). Pour les isolats de la famille des Pythiacées, nous avons utilisé *Phytophthora inundata* (BGA1) et *Pythium undulatum* (BME) cultivés et maintenus sur du milieu PDA.

2. Cinétique de production de molécules à activité anti-oomycète par les cultures de BCAs fongiques

Pour chaque agent antagoniste, A2, A3 et A7, une suspension de 10^5 spores/ml a été inoculée dans 100 ml de PDB dans des Erlenmeyers de 250 ml, puis mis à incuber durant 3, 4, 5, 6 et 7 jours à une température de 26°C et sous agitation à 150 rpm. Après incubation, les cultures liquides ont été filtrées avec un filtre à 100µm de maille, avant d'être filtré avec des filtres Whatman No.1 de diamètre de pore de 0,22 µm pour éliminer les spores produites par le mycélium. Deux volumes, 2 ml et 5 ml, respectivement de chaque filtrat de culture ont été incorporés dans des boîtes de Petri contenant 20 ml de milieu PDA additionnés de streptomycine (300 mg/l), conduisant à une concentration en pourcentage du filtrat de culture de 10% (v/v) et 25% (v/v), respectivement. Les mêmes volumes de 2 et 5ml du milieu PDB ont été incorporés dans les boîtes témoins.

Pour mesurer, l'activité anti-oomycète des filtrats de culture, un implant mycélien de *Pythium undulatum* (BME) ou *Phytophthora inundata* (BGA1) de 5 mm de diamètre a été déposée au centre de la boîte de Petri et mis à incuber à une température de 26°C. Le diamètre de la croissance radiale des isolats *Pythium undulatum* (BME) et *Phytophthora inundata* (BGA1) a été mesuré après 24 h, 48 h et 72 h.

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne a été calculé selon la formule proposée par Hmouni et al.(1996) :

$$I (\%) = (1 - C_n/C_o) \times 100$$

avec C_n : Diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste

C_o : Diamètre moyen des colonies témoins

3. Caractéristiques biochimiques des molécules à activité anti-oomycète du filtrat d'une culture de 7 jours de l'isolat *A. westerdijkiae* (A7)

Pour la production des molécules à activité anti-oomycète d'*A. westerdijkiae*, des cultures ont été préparées à partir de l'isolat *A. westerdijkiae* (A7) dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacune 100 ml de milieu PDB inoculé par 10^5 spores / ml et incubés pendant 7 jours, à 26°C et sous agitation à 150 rpm. Après incubation, le surnageant collecté de ces cultures a été filtré deux fois ; la première avec un filtre à maille de 100 µm et la seconde en utilisant des filtres millipores de 0,22 µm afin d'éliminer les spores produites.

3.1. Test de thermostabilité

Afin de rechercher la nature biochimique des molécules à activité anti-oomycète, le filtrat d'une culture de 7 jours d'*A. westerdijkiae* (A7) a été chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 min. Le précipité formé a été ensuite éliminé par centrifugation à 3000 g pendant 15 min, puis le surnageant a été récupéré, filtré et ensuite incorporé à différentes concentrations en pourcentage (3 et 10 % (v/v)) dans le milieu PDA. La mesure de l'activité anti-oomycète sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1) a été réalisée comme décrite dans le paragraphe 2.

3.2. Dialyse du surnageant

Le filtrat d'une culture d'*A. westerdijkiae* (A7) a été dialysé toute la nuit contre le milieu PDB à température ambiante à travers un boudin de dialyse de 20 cm de long qui permet de laisser passer les molécules <à 3500Da. Son activité anti-oomycète a été testée de la même manière que pour le test de thermostabilité sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1).

4. Extraction des molécules

Les molécules des filtrats obtenus à partir de plusieurs cultures d'*A. westerdijkiae* de 7 jours (780 mL) ont été extraites en utilisant de l'acétate d'éthyle dans les proportions (1/1; V/V) en ampoule à décanter. L'acétate d'éthyle a été choisi comme solvant organique car présentant une polarité moyenne. Après agitation, les deux phases obtenues, la phase organique et la phase aqueuse ont été récupérées séparément, puis concentrées à sec, respectivement par évaporation du solvant organique à l'aide d'un évaporateur rotatif et par lyophilisation de la phase aqueuse congelée. Après avoir mesuré le poids sec des deux extraits, ils ont été ensuite repris respectivement, dans un volume de 6 ml de méthanol (MeOH).

L'activité anti-oomycète des deux extraits a été testée vis-à-vis de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1), comme décrit au paragraphe 2, mais en tenant compte de la différence de concentration des molécules en solution méthanolique et dans le filtrat de culture, afin de se placer dans les mêmes conditions soit aux concentrations en pourcentages de 3, 10 et 25% (v/v) dans le milieu de culture PDA.

5. Purification des molécules actives

Après extraction du filtrat de culture de l'isolat *A. westerdijkiae* A7 à l'acétate d'éthyle, récupération de la phase organique puis concentration, nous avons obtenu 21 mg d'extrait sec qui a été soumis à plusieurs étapes de purification par HPLC pour aboutir à des molécules pures. L'extrait sec a été dissous dans 400µl d'un mélange de méthanol/acétonitrile (V/V ; 1/1). La séparation des différentes molécules a été réalisée sur une colonne préparative Kinetex 5 µm C18-100 Å (250 x 21,2 mm) avec un gradient d'élution constitué des solutions A (H₂O/CH₃CN: 95/5) et B (H₂O/CH₃CN: 5/95) à un débit de 15 ml min⁻¹ (Tableau 7). Après chaque étape, l'activité inhibitrice de la solution obtenue a été évaluée par test sur disques.

Tableau 7. Gradient d'élution

Temps (min)	% B
0	19
4	19
8	50
24	100
32	100
36	19

6. Evaluation de l'activité anti-oomycète de l'isolat *A. westerdijkiae* (A7)

L'activité anti-oomycète de chaque fraction purifiée par HPLC a été évaluée par test sur disques en papier sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1). L'évaluation effectuée a été visuelle en notant la présence ou l'absence de l'activité anti-oomycète des fractions sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1). Deux volumes de chaque fraction collectée (10 µl et 20 µl) ont été déposés sur un disque en papier, soit directement placé sur un implant portant l'isolat BGA1 (Figure 16-A) ;

soit d'une façon équidistante de 2 cm de l'implant mycélien de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1) (Figure 16-B).

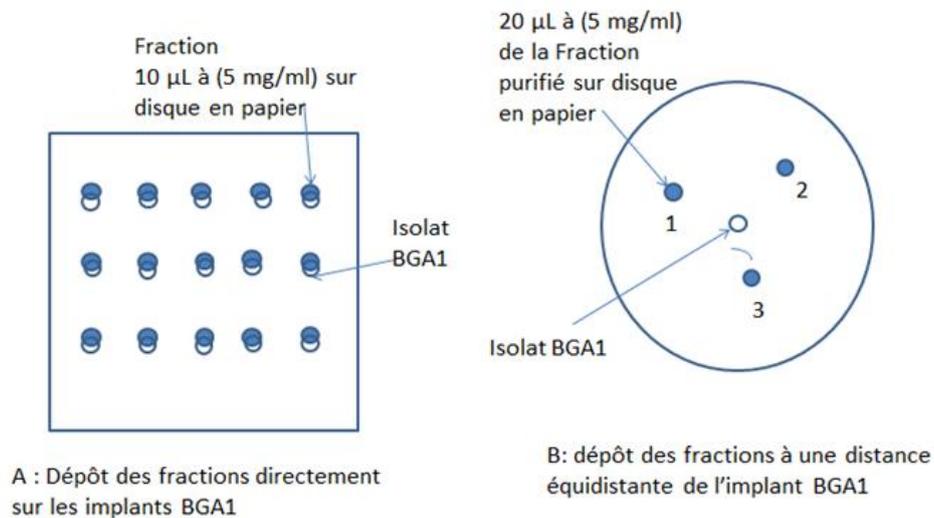


Figure 16. Évaluation de l'activité anti-oomycète des fractions purifiées par HPLC (A) : dépôt des fractions directement sur les implants de *Phytophthora inundata* (BGA1) ; (B): les disques avec différentes fractions placées à distance égale de l'implant de *Phytophthora inundata* (BGA1) placé au centre de la boîte

7. Caractérisation chimique des biomolécules

7.1. Spectroscopie de Masse couplée à la chromatographie liquide LC/MS

L'échantillon purifié présentant une forte activité anti-oomycète a été injecté en spectroscopie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC/MS) sur un appareil Bruker MAXIS II (élution LC avec un gradient de 20 min H₂O/CH₃CN : 100/0 à 0/100).

7.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Le même échantillon collecté a été caractérisé par « Résonance Magnétique Nucléaire RMN (plateforme du MNHN).

Résultats

1. Cinétique de production des molécules anti-oomycète des filtrats de culture des BCAs fongique *T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A3 et *A. westerdijkiae* A7

Nous avons étudié la production de molécules anti-oomycète au cours de la croissance des trois isolats fongiques *T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A3 et *A. westerdijkiae* A7 afin de définir l'optimum de production de ces molécules inhibitrices dans le filtrat de culture. Pour cela, nous avons prélevé les filtrats de culture entre trois et sept jours de croissance et mesuré leur activité inhibitrice après incorporation dans le milieu de culture à 10 ou à 25 % (v/v) respectivement. Le milieu témoin contenait 10 ou 25 % (v/v) respectivement de milieu PDB. Nous avons testé les couples (BCA / isolat Pythiacée) suivants :

- *T. simmonsii* A2 vis-à-vis de *Pythium undulatum* BME (Figure 17)
- *A. westerdijkiae* A7 vis-à-vis de *Pythium undulatum* BME (Figure 17)
- *T. asperellum* A3 vis-à-vis de *Phytophthora inundata* BGA1 (Figure 18)
- *A. westerdijkiae* A7 vis-à-vis de *Phytophthora inundata* BGA1 (Figure 18)

Les résultats montrent une inhibition totale de la croissance mycélienne des deux Pythiacées *Phytophthora inundata* BGA1 et *Pythium undulatum* BME par l'isolat *A. westerdijkiae* A7 à une concentration en pourcentage du filtrat de 10% (v/v), à partir de quatre et cinq jours d'incubation à 26°C respectivement. Pour une concentration finale de 25% (v/v) du filtrat, l'inhibition totale de la croissance mycélienne des deux isolats a été enregistrée dès 3 jours d'incubation de cet isolat (Figures 17 et 18).

Les filtrats des isolats *T. simmonsii* A2 et *T. asperellum* A3 montrent une activité anti-oomycète bien plus limitée (<40%) y compris à une concentration de 25% (v/v) quelque soit la durée d'incubation.

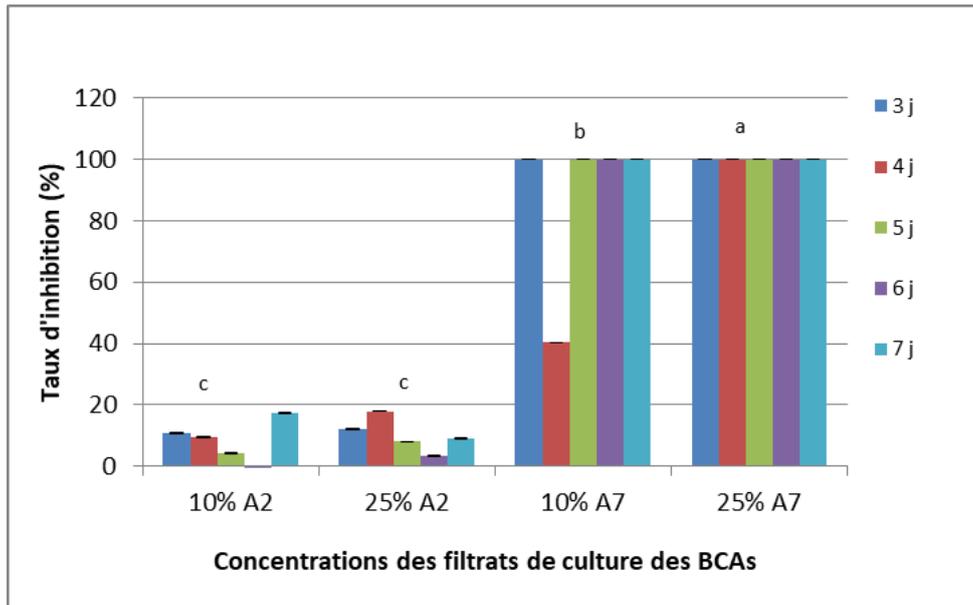


Figure 17. Activité anti-Pythiacées des filtrats de culture de *T. simmonsii* (A2) et d'*A. westerdijkiae* (A7) collectés sur une période de 3 à 7 jours d'incubation à des concentrations de 10 et 25% (v/v) du filtrat sur la croissance mycélienne de *Pythium undulatum* (BME) après 72 h d'incubation à 26°C. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ selon le test de Duncan.

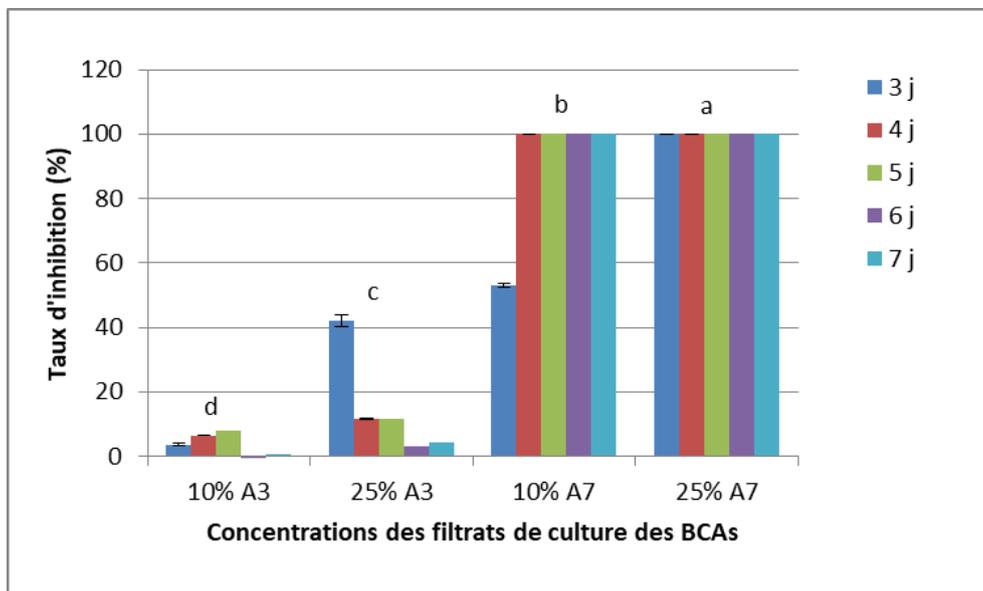


Figure 18. Activité anti-Pythiacées des filtrats de culture de de *T. asperellum* (A3) et d'*A. westerdijkiae* (A7) collectés sur une période de 3 à 7 jours d'incubation à des concentrations de 10 et 25% (v/v) sur la croissance mycélienne de *Phytophthora inundata* (BGA1) après 72 h d'incubation à 26°C. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ selon le test de Duncan.

2. Détermination de la nature biochimique des molécules anti-Pythiacées produites par *Aspergillus westerdijkiae* A7

En se référant aux résultats obtenus précédemment, nous avons décidé de concentrer nos efforts sur la caractérisation biochimique du filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7) qui montrait la plus forte activité anti-oomycète. S'agit-il d'enzymes lytiques ou de métabolites secondaires qui sont responsables de l'activité anti-Pythiacées du filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7) ? Afin de déterminer la nature chimique des molécules produites par cet isolat après 7 jours d'incubation et de déterminer la méthode de purification de celles-ci, deux tests ont été mis en place.

2.1. Thermostabilité du filtrat

Le test de thermostabilité consiste à chauffer le filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* à 100°C pendant 15 min. Ce traitement sert à dénaturer les protéines, notamment les enzymes lytiques produits, et de ne garder que les métabolites secondaires qui sont généralement thermorésistants. Le filtrat ainsi traité a été incorporé dans le milieu de culture PDA, à 3% et 10% concentration finale (v/v) respectivement, pour l'évaluation de l'activité inhibitrice sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1).

Les résultats montrent que le filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7) chauffé et testé à une concentration de 10% (v/v) a inhibé complètement la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1) après 3 jours d'incubation (Figure 19). Nous pouvons donc conclure qu'après thermo-inactivation des protéines, l'activité inhibitrice du filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7) est maintenue montrant que les protéines thermolabiles ne sont pas responsables de l'activité anti-Pythiacées.

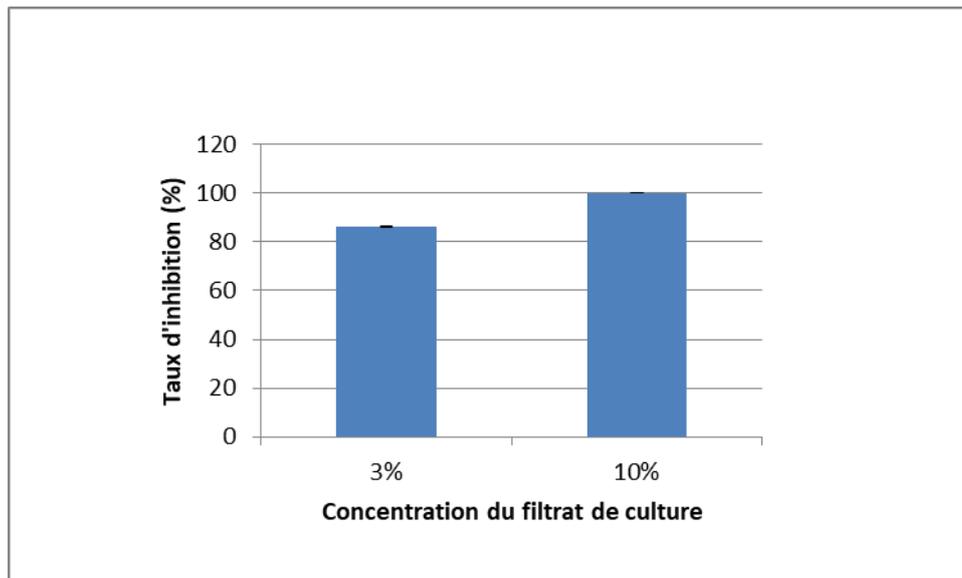


Figure 19. Thermo-stabilité de l'activité anti-oomycète du filtrat de culture d'*Aspergillus westerdijkiae* A7 sur la croissance mycélienne de *Phytophthora inundata* (BGA1) après 72h d'incubation à 26°C. Le filtrat a été chauffé à 100°C pendant 15 min puis incorporé au milieu à 3 et 10% (v/v) concentration finale respectivement. Le graphique représente la moyenne des données et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard (n=3)

2.2. Test de Dialyse

Le test de dialyse consiste à faire diffuser les molécules ayant un poids moléculaire (<3500Da) du filtrat de culture d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7) vers le milieu de culture PDB à travers un boudin de dialyse et par conséquent de ne garder que les molécules de grandes tailles (PM >3500Da) tels que les enzymes lytiques. L'évaluation de l'activité anti-*Phytophthora inundata* (BGA1) du filtrat dialysé incorporé dans le milieu de culture à des concentrations de 3 et de 10% (v/v) a été effectuée.

À la concentration de 10% (v/v) du filtrat dialysé, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthora inundata* (BGA1) est de 22% (Figure 20). Le potentiel inhibiteur du filtrat d'*A. westerdijkiae*, a fortement diminué, ce qui nous amène à conclure que les protéines, e ;g., enzymes lytiques, participent à l'activité anti-Pythiacées mais ne sont pas les molécules majeures responsables de l'inhibition de la croissance des Pythiacées. Il s'agit potentiellement d'un ou de plusieurs métabolite(s) secondaires à faible poids moléculaire <3500Da ayant diffusé à travers la membrane de dialyse qui serai(en)t responsable(s) de la forte activité anti-oomycète.

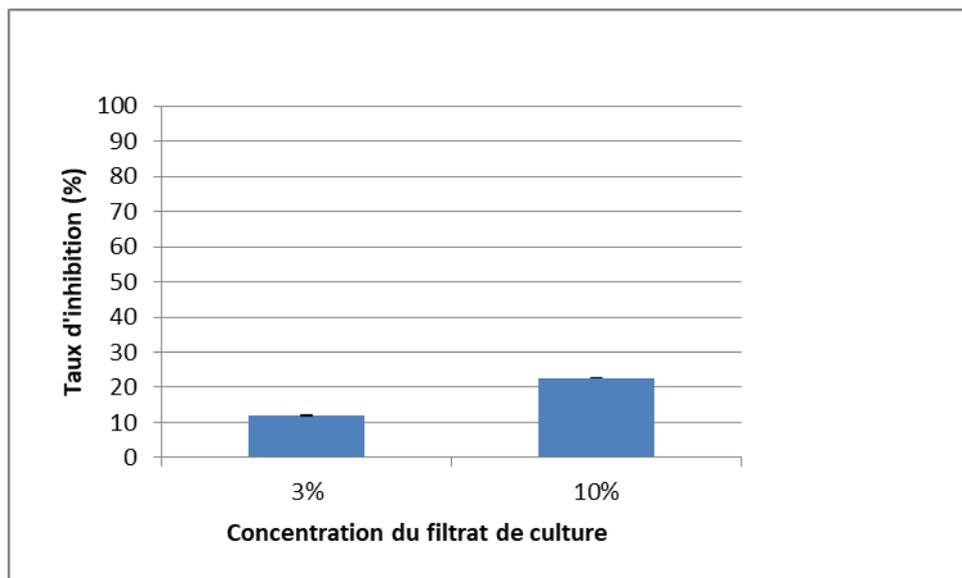


Figure 20. Activité anti-oomycète du filtrat de culture d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7) après dialyse sur la croissance mycélienne de *Phytophthora inundata* (BGA1) après 72 d'incubation à 26°C. Le filtrat dialysé (cutoff 3500 Da) a été incorporé dans le milieu PDA à une concentration finale de 3 et 10% (v/v) respectivement. Le graphique représente la moyenne des données et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard (n=3)

3. Caractérisation chimique des molécules actives produites par la souche *Aspergillus westerdijkiae* A7

3.1. Extraction des métabolites anti-pythiacées

Nous avons procédé à l'extraction par l'acétate d'éthyle des molécules anti-pythiacées du filtrat de culture d'*Aspergillus westerdijkiae* A7 après incubation pendant 7 jours dans du milieu PDB à 26°C (voir Matériel et Méthodes). Les lyophilisats obtenus après extraction, et la concentration à sec des deux phases (organique et aqueuse), ont été dissouts respectivement dans du méthanol (MeOH) et leur activité anti-pythiacées a été évaluée sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1 à des concentrations équivalentes à 3, 10 et 25 % (v/v) du filtrat respectivement (Figures 21).

Comme le montre la figure 22, les taux d'inhibition les plus forts ont été observés avec la phase organique incorporé dans le milieu de culture : >50% d'inhibition à la concentration de 10% et >70% d'inhibition à la concentration de 25%, alors que aux mêmes concentrations, la phase aqueuse entraîne des taux d'inhibitions inférieurs à 30% ou à 40% respectivement. Ce résultat nous a conduit à purifier les composés actifs à partir de la phase organique.

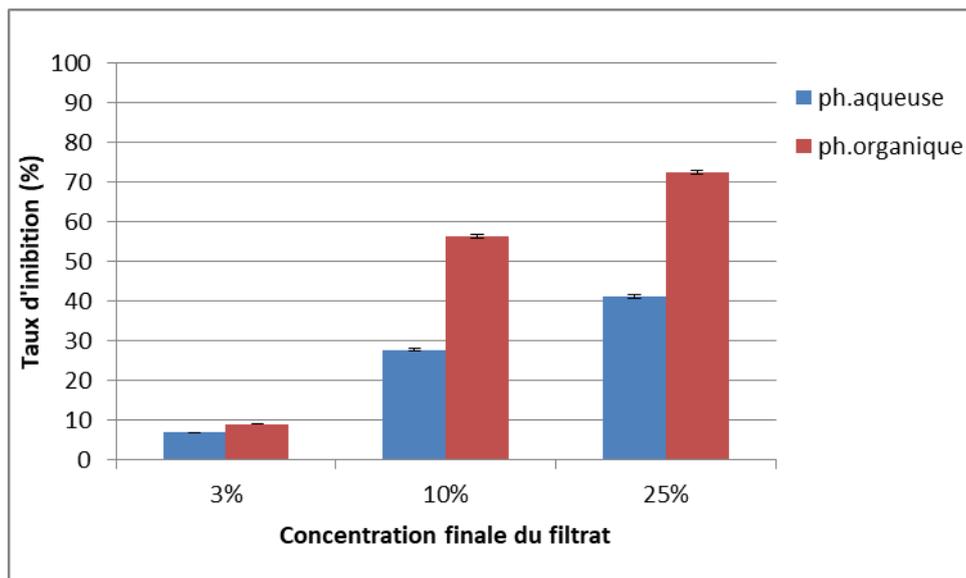


Figure 21. Activité inhibitrice de la phase aqueuse et de la phase organique après extraction à l'acétate d'éthyle (1/1) du filtrat de culture d'*Aspergillus westerdijkiae* A7 vis-à-vis de *Phytophthora inundata* (BGA1) après 48h d'incubation. Des concentrations en pourcentage équivalentes à 3, 10 et 25% (v/v) du filtrat de culture ont été testées. Le graphique représente la moyenne des données et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard (n=3)

3.2. Purification des composés actifs du filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* (A7)

L'extrait de la phase organique de filtrat de culture d'*Aspergillus westerdijkiae* A7 a été fractionné par HPLC. L'étape de la purification nous a permis de collecter 17 fractions séparément, correspondant aux pics détectés par UV à 250 nm. Chaque fraction collectée a été concentrée au Speedvac puis pesée. Les caractéristiques des différentes fractions collectées par HPLC sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8. Caractéristiques de différentes fractions collectées par HPLC à partir filtrat de culture d'*A. westerdijkiae* A7

Fractions	Temps de rétention (min)	Poids des fractions (mg)
1	3,0-3,5	0,3
2	3,5-3,9	0,9
3	4-4,2	0,7
4	4,2-4,4	0,4
5	4,5-4,7	2,6
6	4,9 -5,1	1,1
7	5,3-6	0,7
8	6,1-6,3	3,3
9	7,1-7,3	0,6
10	8,1-9	0,1
11	9,1-9,8	1
12	10-10,5	0,1
13	10,9-11,5	1
14	11,9-12,1	0,1
15	12,6-12,8	0,1
16	13,4-13,6	0,8
17	18,8-19	0,5

Les fractions ont été ensuite reprises dans 1 ml de méthanol et leur activité anti-oomycète a été testée sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1). Après 48h d'incubation à 26°C, nous avons observé une importante activité inhibitrice par la fraction F10 collectée à un temps de rétention de 8,1 à 9 min (Tableau 8). La fraction 10 s'est montrée fongicide en inhibant complètement la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1). De plus cette fraction diffuse bien dans le milieu comme le montre la figure 22. Elle représente en mg moins de 1% de la totalité des 17 fractions récoltées (Tableau 8).

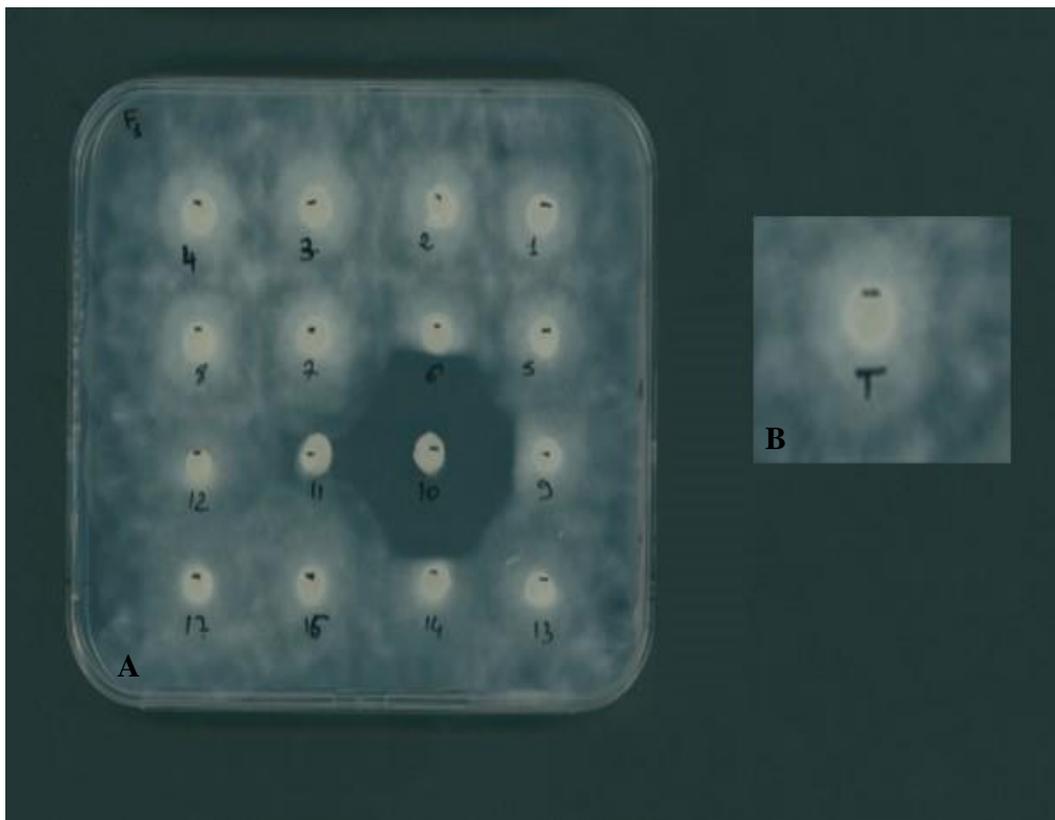


Figure 22. Activité inhibitrice des fractions séparées par HPLC de l'extrait organique du filtrat d'*Aspergillus westerdijkiae* A7 sur la croissance mycélienne de *Phytophthora inundata* (BGA1) après 7 jours d'incubation à 26°C. A : Un volume de 10 μ l (5 mg/ml) de chaque fraction a été déposé sur un disque en papier directement placé sur un implant portant l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1. B : Témoin avec dépôt de 10 μ l (5 mg/ml) du MeOH sur le disque en papier placé sur l'implant l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1)

Le chromatogramme HPLC de la fraction active F10 présentait quatre pics qui ont été collectés séparément (Figure 23-B), concentrés puis testés pour leurs activités anti-oomycète. D'après les résultats obtenus, seule la solution correspondant au pic ayant un temps de rétention de 13,2 min est active en inhibant la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1. Cette solution active a été le siège d'une nouvelle purification avec les mêmes solvants A et B sur une colonne Kinetex 5 μ m C18-100 Å (250 x 4.6 mm) avec un débit de 1 mL.min⁻¹ (Figure 23-C).

Le chromatogramme correspondant à cette nouvelle purification par HPLC révèle différents pics, l'un plus développé que d'autres. L'activité anti-oomycète de sous-fractions

correspondantes aux différents pics enregistrés sur le chromatogramme (Figure 23-C) a été évaluée sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1. Seul le composé élué à 18,7 min s'est montré efficace en inhibant complètement la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1. La molécule active correspondante à ce pic est nommée MA.

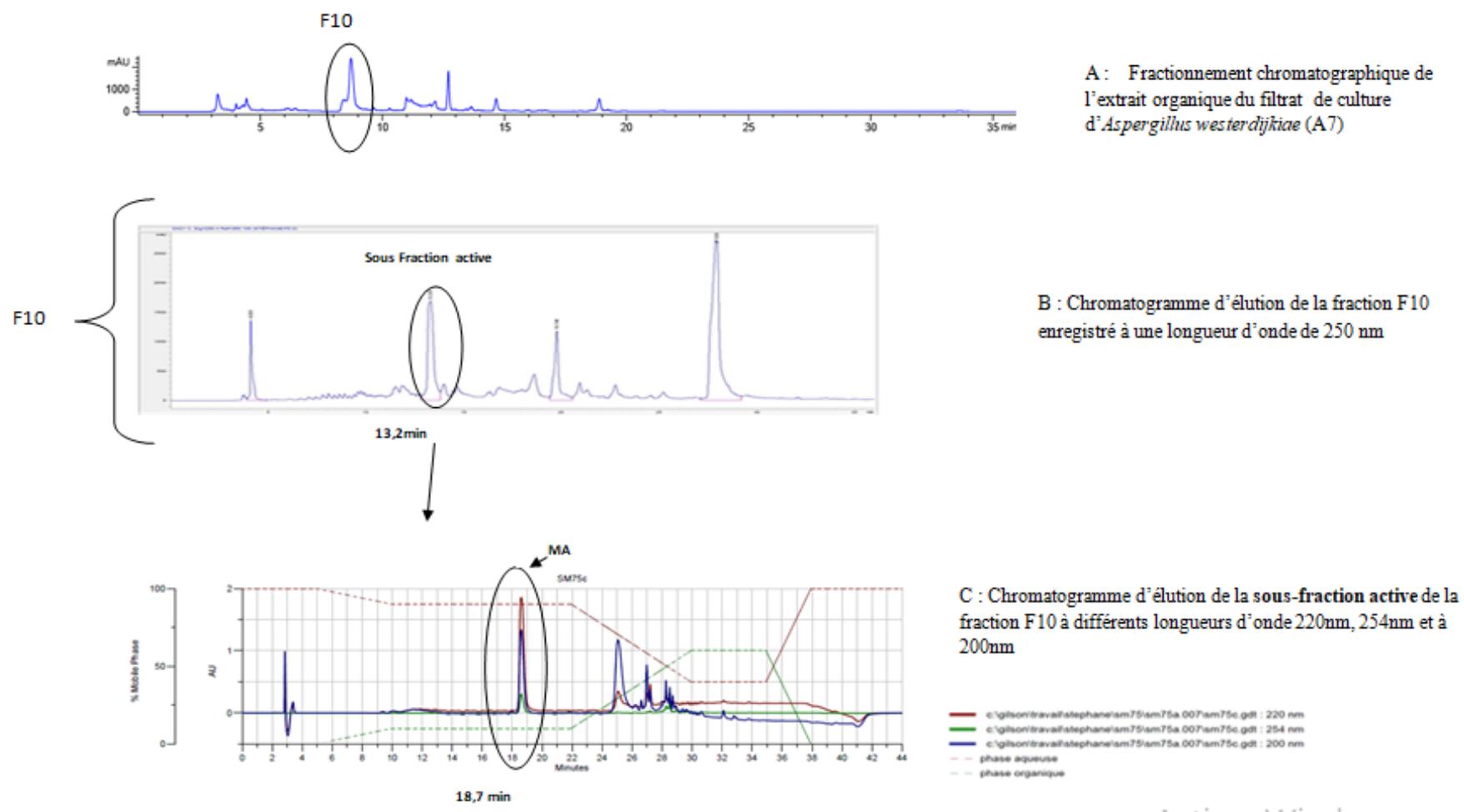


Figure 23. Schéma présentant les étapes successives de purification de l'extrait organique du filtrat de culture d'*A. westerdijkiae* (A7) jusqu'à l'isolement de la molécule active (MA) à activité anti-oomycète

3.3. Caractérisation chimique de la molécule active (MA) par RMN et LC/MS

Pour l'identification de la structure chimique de la molécule active MA, nous avons collecté et analysé le composé purifié élué à 18,7 min en utilisant deux techniques spectroscopiques : la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS). Les données spectrales RMN (^1H , ^{13}C) de la molécule active MA ainsi que leurs interprétations sont présentées en Annexe.

L'analyse du composé MA par LC-MS couplé à un détecteur UV-visible, nous a permis de déterminer la structure selon les ions moléculaires (Figure 25). D'après le chromatogramme en couleur orange correspondant à l'EIC (Extract Ion Chromatogram), présenté sur le spectre d'absorption UV-visible, nous avons identifié l'ion moléculaire mono-chargé à un temps de rétention de 6.3 min. Ce temps de rétention correspond à l'acide pénicillique soit m/z 171.063 (Figure 24).

Le processus d'ionisation de la molécule est identifié par un détecteur, tout au long de son passage dans le tube de l'appareil LC/MS en donnant naissance à des ions. Ces ions sont représentés sous forme de pics dans la figure 24.

Lorsque la molécule (M) est injectée dans le spectromètre de masse, elle est tout d'abord ionisée en captant un proton H^+ , elle devient alors $[\text{M}+\text{H}]^+$ possédant une masse $170+1=171$ ou en captant un ion Na^+ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et possède une masse $170+23=193$ que l'on note m/z ("masse sur charge", dans notre cas la charge vaut 1). L'appareil LC/MS que nous avons utilisée est suffisamment performant, pour nous donner la formule brute des ions. Nous avons observé l'ion m/z à 171,0637 qui est l'espèce $[\text{M}+\text{H}]^+$ de l'acide pénicillique (calculé d'après la formule chimique $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_4^+$). Nous avons observé d'autres pics correspondants à m/z 153 et à m/z 125 que l'on interprète par des pertes successives de H_2O et de CO . L'analyse de ces ions détectés nous a permis de caractériser la molécule active qui est l'acide pénicillique.

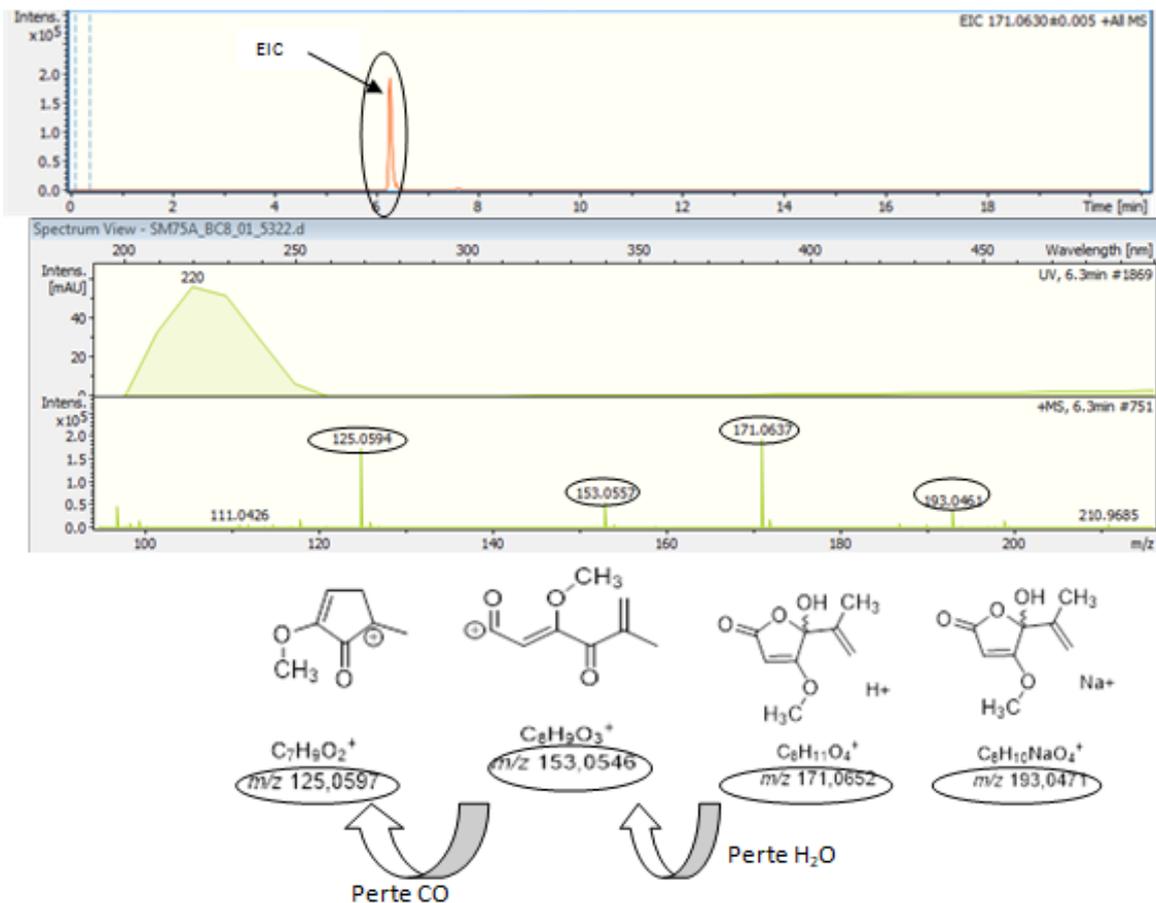


Figure 24. Spectrométrie de masse LC-MS couplé à un détecteur UV-visible de la molécule active MA avec interprétation des ions observés. Pour les explications voir texte.

Le couplage des informations apportées par la LC/MS et la RMN ont permis d'élucider la stéréochimie de la molécule à activité anti-oomycète. Il s'agit donc de l'acide pénicillique.

L'activité anti-oomycète du produit purifié et caractérisé tant que « acide pénicillique » a été re-testée sur la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1 (Figure 25). L'acide pénicillique a complètement inhibé la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1 à partir d'un volume de 5 µl à une concentration (2,5 µg/ µl).

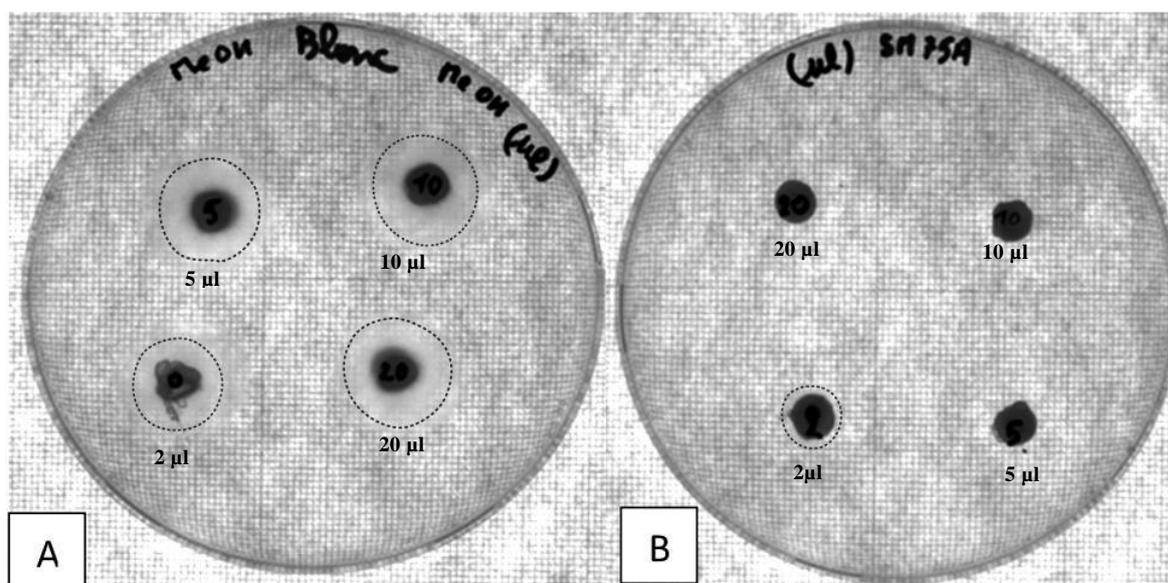


Figure 25. Activité anti-oomycète de l'acide pénicillique sur la croissance mycélienne de *Phytophthora inundata* BGA1 après 24 h d'incubation à 28°C. A : Boîte témoin avec différents volumes de méthanol ; B : Boîte test avec l'acide pénicillique. La solution méthanolique de 2,5 mg/ml d'acide pénicillique a été déposée avec des volumes de 2, 5, 10 et 20 µl (soit 5 ; 12,5 ; 25 et 50 µg respectivement) sur un disque en papier directement placé sur l'implant de l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1. Le halo correspondant à la croissance mycélienne de l'isolat BGA1 est souligné par les traits hachurés.

Conclusion-discussion

Nos travaux de thèse ayant eu pour objectif d'isoler un micro-organisme agissant par antibiose nous a conduit à sélectionner l'isolat *A. westerdijkiae* A7 pour son potentiel à sécréter une ou plusieurs molécules à très forte activité anti-oomycète. La stabilité thermique de cette/ces molécule(s) sécrétée(s) dans le filtrat de culture par cet isolat, le taux d'inhibition important de la croissance mycélienne des Pythiacées testés, ainsi que la reproductibilité de l'activité anti-oomycète, nous ont amenés à établir une démarche allant de l'extraction des molécules actives produites par cet isolat à leur caractérisation chimique. Cette caractérisation a abouti à l'identification de l'acide pénicillique (acide 3-méthoxy-5-méthyl-4-oxo-2,5-hexadiénoïque) en tant que principale molécule responsable de l'inhibition de la croissance mycélienne des Pythiacées testés.

L'acide pénicillique est un métabolite secondaire appartenant à une classe de lactones cycliques (Bando et *al.*, 2003; Frisvad., 2018). Il qui a été isolé pour la première fois à partir

de *Penicillium puberulum* (Alsberg et Black, 1913; Frisvad., 2018). Cette mycotoxine est produite essentiellement par les espèces du genre *Aspergillus* telles que *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. steynii* et *A. persii* ainsi que par des espèces du genre *Penicillium* (Visagie et al., 2014a ; Frisvad, 2018 ; Nguyen et al., 2016).

L'acide pénicillique possède de nombreuses activités biologiques (antifongique, antivirale, antibactérienne, anti-tumorale, antidiurétique, phytotoxique, cytotoxique, hépatotoxique, néphrotoxique) (Kang et Kim, 2004; Ezzat et al., 2007; Chan et Hayes, 1981; Grabsch et al., 2006). L'effet antibactérien de l'acide pénicillique a été signalé pour la première fois contre les bactéries Gram+ et Gram- par Oxford en 1942. Parmi ces espèces bactériennes, on trouve *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus* et *Streptococcus faecalis* (Ezzat et al., 2007). L'effet antibiotique de l'acide pénicillique a également été signalé contre les bactéries phytopathogènes (Ezzat et al. 2007; Nguyen et al., 2016). L'acide pénicillique agit sur les bactéries cibles en modifiant leur morphologie (volume cellulaire et formation de cellules filamenteuses allongées) (Auffray et al. 1984). Il peut également agir en synergie avec d'autres mycotoxines telle que la patuline en inhibant la communication entre les cellules, agissant sur le mécanisme du « quorum sensing » (Williams, 2002; Rasmussen et al., 2005). L'activité anti-oomycète de l'acide pénicillique isolé à partir du filtrat de culture d'*Aspergillus sclerotiorum* a été montrée contre des espèces de *Phytophthora* spp (Kang et Kim, 2004). Des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'acide pénicillique se situent entre 1 à 25 µg/ml contre des espèces de *Phytophthora* spp testées (*P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. infestans*, *P. nicotianae*). Notre étude est la première à démontrer cette activité contre *Phytophthora inundata* se situant dans le même ordre de grandeur que celui testé par Kang et Kim (2004).

L'acide pénicillique est surtout connu pour sa toxicité vis-à-vis des animaux. La dose à laquelle 50% d'une population testée meurt, appelée DL50 est de 100 mg/kg pour les souris (Bando et al., 2003). Cette dose correspond à la catégorie des substances modérément toxiques pour l'homme selon l'échelle de classification de Gosselin Smith et Hodge (Gosselin, 1984 ; Bando et al., 2003). La CMI de l'acide pénicillique contre les *Phytophthora* spp est de 1 à 25 µg/ml (Kang et Kim, 2004; cette étude). Considérant la densité du tissu de la souris à environ 1 kg/l, la DL50 est approximativement de 100 µg/ml, soit entre 10 et 100 fois plus élevée que la CMI observée contre *Phytophthora* spp.

L'acide pénicillique est aussi considéré cardiotoxique et cancérigène (Vesely et Vesela, 1991; Dickens et Jones, 1961, Ciegler et *al.*, 1971), mais son effet cancérigène a surtout été étudié en association avec d'autres toxines. Certaines études ont montré des effets synergiques de l'acide pénicillique avec la patuline, elle aussi produite par les *Aspergilli* (Umeda et *al.*, 1977). Il a été montré que ces deux mycotoxines interagissaient systématiquement avec l'ADN dans les systèmes cellulaires bactériens et eucaryotes supérieurs (Umeda et *al.*, 1977). Des effets synergiques toxiques ont été mentionnés avec l'ochratoxine sur des lignées cellulaires de macrophages bovins (Oh et *al.*, 2015) et des lymphocytes chez les porcs (Bernhoft et *al.*, 2004).

Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé l'acide pénicillique comme appartenant au groupe 3, ce qui signifie qu'il n'est pas cancérigène pour l'homme (IARC, 1972) mais compte tenu de son activité cancérigène signalée par Dickens et Jones, 1961 ainsi que les propriétés cancérigènes prouvées de l'ochratoxine (Vega et *al.*, 2006; Mata et *al.* 2007; Noonim et *al.*, 2008; Gil-Serna et *al.*, 2015) c'est la combinaison qui pourrait avoir des potentiels cancérigènes.

Le mode d'action de l'acide pénicillique est multiple. Il peut être dû à son interaction avec les résidus *via* les groupements SH des enzymes (Ciegler, 1972 ; Ismaïel et Papenbrock, 2015). Probablement par le biais de cette interaction, l'acide pénicillique inhibe les alcool- et les lactate-déshydrogénases (Ashoor et Chu, 1973) ainsi que l'uréase et la RNAase (Reiss, 1979 ; Tashiro et *al.*, 1979). Il induit également des ruptures d'ADN dans les cellules mammifères (Umeda et *al.*, 1977 ; Mori et *al.*, 1984).

L'acide pénicillique possède également des propriétés phytotoxiques (Ghadevaru, 2013; Ismaïel et Papenbrock, 2015). Il peut affecter la qualité des semis (germination, viabilité...) et la vigueur et la croissance racinaire des plantes (Ismaïel et Papenbrock, 2015; Frisvad, 2018). L'inhibition de la croissance racinaire induite par l'acide pénicillique a été montrée sur plusieurs cultures telles que le riz, l'Amarante hypocondriaque, la fève et le pois (Sassa et *al.*, 1971 ; Martínez-Luis et *al.*, 2005; Ismaïel et Papenbrock, 2015). Le degré de phytotoxicité observé de cette mycotoxine est variable selon l'hôte. En effet, pour des concentrations de 250 ou 500 µg/ml, l'acide pénicillique induit un léger brunissement des racines du conifère *Pinus glehnii* alors que pour la laitue, à la même dose on observe la destruction de la structure des racines et une inhibition de la croissance des semis (Yamaji et *al.*, 2005).

Etant donné que l'acide pénicillique possède des propriétés toxiques il présente ainsi un risque potentiel pour la santé humaine et animale (Bando et *al.*, 2003), même à des doses plus fortes que celles observées contre les oomycètes. Par conséquent, l'isolat *Aspergillus westerdijkiae* A7 ne pourra pas être utilisé en tant que BCA puisqu'il produit cette mycotoxine, malgré les résultats très prometteurs que nous avons obtenus *in planta* (chapitre II). Nous devons par ailleurs considérer le risque cancérigène de l'isolat. En effet, en plus de l'acide pénicillique, l'*A. westerdijkiae* peut être producteur de l'ochratoxine (Marino et *al.*, 2009).

Les résultats obtenus dans ce chapitre mettent en question notre choix de sélectionner l'isolat *A. westerdijkiae* A7. En effet, malgré le fait que les espèces du genre *Aspergillus* soient très intéressantes du point de vue de leur richesse en métabolites secondaires et que l'activité anti-oomycète de ces métabolites secondaires soit peu étudiée, elles présenteraient tout de même plus de risques à identifier des métabolites secondaires toxiques que celles des isolats du genre *Trichoderma*. L'isolat *A. westerdijkiae* A7 s'est montré particulièrement efficace en inhibant complètement le développement d'isolats Pythiacées (*Phytophthora inundata*, *Pythium undulatum*). Seul cet isolat *A. westerdijkiae* A7 a été aussi performant par rapport aux deux autres isolats testés de la même espèce (A10 et A13). Nous avons donc posé l'hypothèse qu'il s'agissait peut-être d'une nouvelle molécule active sécrétée spécifiquement par cet isolat. Il nous a paru prometteur de travailler sur un isolat appartenant au genre *Aspergillus* connu pour être producteur de métabolites secondaires dont le potentiel anti-oomycète reste inexploré. Cette démarche a été effectuée en se focalisant sur la possibilité d'identifier (une) ou (des) nouvelle(s) molécule(s), tout en acceptant le risque d'identifier des mycotoxines.

L'identification de l'acide pénicillique en tant que molécule responsable de la majeure partie de l'inhibition vis-à-vis des Pythiacées, nous amène maintenant à proposer une démarche plus ciblée en redéfinissant nos objectifs dès la phase de pré-criblage : l'un des critères pourrait être de sélectionner seulement des microorganismes ne présentant pas de risque de toxicité en se basant sur la littérature dans le but de sélectionner un BCA utilisable en pratique en plein champ. Une autre possibilité pourrait être de cribler l'activité anti-oomycète de tous les microorganismes y compris ceux pouvant présenter un risque de toxicité, en éliminant les isolats toxiques en testant leur capacité à produire les mycotoxines connues spécifiques à leur espèce. Par exemple, pour les isolats appartenant aux genres *Aspergillus* ou *Penicillium*, une simple méthode de criblage de la production d'ochratoxine peut être effectuée en cultivant les isolats sur un milieu spécifique Czapek

Yeast Agar (CYA) (Bragulat et *al.*, 2001). Cette démarche vise à sélectionner les isolats non toxigènes dans le but d'optimiser la recherche de nouvelles molécules à activité anti-oomycète issues de ces microorganismes.

La biosynthèse des métabolites secondaires étant fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles le champignon est cultivé, un changement des conditions de culture des champignons (milieu de culture, paramètres physicochimiques) peut agir sur la capacité du champignon à produire différents métabolites secondaires et ainsi augmenter la probabilité d'identifier des composés ayant l'activité biologique recherchée (Vinale et *al.*, 2008). Ainsi, il peut aussi être intéressant de cribler l'activité anti-oomycète produite par les filtrats de cultures des isolats retenus après nos cribles *in vitro* en présence de l'isolat pathogène comme éliciteur afin de favoriser la production de molécules spécifiques.

D'après les résultats obtenus dans ce chapitre, nous pouvons également souligner l'importance d'un criblage plus large, en utilisant un nombre important d'isolats initiaux afin d'augmenter la probabilité de découvrir de nouvelles molécules avec les activités recherchées et avec des profils toxicologiques acceptables.

Discussion générale

Un criblage pour l'identification d'un BCA agissant par antibiose

Afin de limiter les dégâts de la maladie du dépérissement du pommier causés par les Pythiacées, plusieurs stratégies de lutte ont été adoptées (décrites dans le chapitre I). L'attention mondiale s'est orientée vers le développement de la lutte biologique comme alternative à la lutte chimique afin de réduire les problèmes liés à l'accumulation des résidus dans le sol et de répondre à l'augmentation des phénomènes de résistance aux fongicides de synthèse chez plusieurs espèces de Pythiacées. Les travaux de cette thèse ont été menés dans un contexte de recherche pour identifier soit de nouveaux BCAs soit de nouvelles molécules à activité anti-oomycète issus de ces BCAs.

Activités anti-oomycètes *in vitro* vs. activités protectrices *in planta*

Nous avons réalisé des criblages de collections fongiques et bactériennes à notre disposition à plusieurs niveaux : des criblages visant des activités anti-oomycète sécrétées de plus en plus stringents et des évaluations d'activité protectrice (préventive ou curative) contre deux isolats de Pythiacées *in planta*.

D'après nos résultats, que ce soit pour les essais préventifs ou curatifs, l'application des BCAs seul a réduit significativement les symptômes de dépérissement des plants inoculés par les isolats de Pythiacées. La meilleure protection des plants a été obtenue par l'application de l'isolat *Trichoderma simmonsii* A2 seul sur les plants inoculés avec l'isolat *Phytophthora inundata* BGA1 en comparaison avec l'ensemble des traitements testés, alors que le même isolat, *T. simmonsii* A2 n'était pas le plus prometteur après notre criblage *in vitro* d'isolats agissant par antibiose. En effet, son activité antagoniste *in vitro* a été faible par rapport à l'isolat *A. westerdijkiae* A7 (ayant une activité anti-oomycète de 100% contre les isolats Pythiacées). Par ailleurs, la bactérie B2 s'est montrée plus efficace *in planta* en application curative contre l'isolat *Phytophthora inundata* (BGA1) que l'isolat *A. westerdijkiae* A7 qui nous a semblé l'isolat le plus prometteur en se basant uniquement sur les tests *in vitro* (détaillé dans le chapitre II).

Cela peut, entre autres, être expliqué par le fait que nos criblages *in vitro* ciblaient un mécanisme d'action unique. Dans notre cas, nous avons ciblé l'antibiose comme mode d'action impliquant la production de molécules à activité anti-oomycète que nous pouvions caractériser par la suite. Il est fortement probable que les isolats testés fassent intervenir d'autres mécanismes *in planta* ce qui expliquerait les différences observées. Par ailleurs, la

production de molécules actives sécrétées par les isolats antagonistes peut considérablement différer entre les conditions *in vitro* et *in planta* (Bardin et al., 2015).

La protection observée avec l'isolat *T. simmonsii* A2 *in planta* montrent que les résultats *in vitro* ne peuvent pas nécessairement être en corrélation avec celles enregistrés *in planta* car d'autres variables et facteurs peuvent influencer l'action antagoniste des isolats. L'efficacité de biocontrôle de l'isolat *T. simmonsii* A2 *in planta* pourrait être due à d'autres mécanismes d'action complémentaires à l'antibiose. Afin d'étudier l'utilisation éventuelle de l'isolat *T. simmonsii* A2 en tant que BCA, des études complémentaires doivent être envisagées telles que :

- La détermination des mécanismes d'action de l'isolat *T. simmonsii* A2 *in planta* vis-à-vis du *Phytophthora inundata* (BGA1) ainsi que l'identification des molécules produites pendant cette interaction.
- L'étude de l'efficacité en différentes conditions et sur différentes espèces des Pythiacées.
- L'étude de toxicité de l'isolat *T. simmonsii* A2 est également essentielle pour un éventuel usage en tant que BCA.

Combinaisons de BCAs : Synergie ou Antagonisme ?

Concernant l'évaluation des combinaisons de microorganismes, nous avons constaté des effets synergiques mais également des effets antagonistes. En effet, le traitement préventif combinant l'isolat *A. westerdijkiae* A7 et la bactérie B2 à réduit significativement les symptômes de sévérité de la maladie chez les plants inoculés avec l'isolat *Pythium undulatum* (BME) par rapport au témoin. En essai curatif, le traitement le plus efficace a été enregistré par l'association des isolats *A. westerdijkiae* A7 et *T. simmonsii* A2.

Nos résultats concordent avec plusieurs études qui ont montré que la combinaison des antagonistes traitant plusieurs cultures ont été adoptée avec succès pour gérer les maladies grâce aux interactions bénéfiques et synergiques entre les BCAs (Guetsky et al., 2001; Guetsky et al., 2002; Whipps 2001; Parnell et al., 2016; De Vrieze et al., 2018; Elad et Stewart, 2004; Pertot et al., 2017). D'autres études ont montrés l'efficacité de biocontrôle basés sur un mélange de micro-organismes par rapport à l'usage unique d'un microorganisme (Spadaro, 2004; Gullino, 2004; Sharma et al., 2009). En effet, l'usage d'un mélange d'antagonistes microbiens peut présenter des avantages tels que 1) Elargissement du spectre

des cibles phytopathogènes, 2) diminution de la perte d'efficacité due à des conditions environnementales défavorables, 3) amélioration de l'efficacité du biocontrôle en combinant différents mécanismes de lutte biologique qui peuvent être complémentaires (Spadaro et Gullino, 2005; Stockwell et al., 2011).

A contrario, nous avons constaté une augmentation du taux de sévérité de la maladie du dépérissement chez les plantes inoculées par les isolats Pythiacées et traités par la combinaison des trois BCAs (*A. westerdijkiae* A7 et *T. simmonsii* A2 et *Bacillus* sp B2 ; détaillé dans le chapitre II). Ceci nous a amené à suggérer un effet antagoniste entre les BCAs qui peuvent résulter d'interactions négatives entre eux. Cela peut entraîner l'inhibition du développement du BCA le plus actif, ou engendrer une baisse de production des molécules anti-oomycètes, ou encore promouvoir le développement du pathogène par des processus inconnus. Dans ce sens, nos résultats sont en concordance avec une méta-analyse menée par Xu et al. (2011), montrant que des interactions antagonistes ont été observées dans la majorité des combinaisons entre isolats, alors que seulement 2% des 465 traitements publiés ont signalé des effets synergiques entre les BCAs. Les interactions synergiques entre les BCAs dépendent de multiples paramètres (plante hôte, conditions abiotiques, composition du sol et pathogène ciblé) qu'il convient alors de préciser au cours du développement d'un traitement BCA.

Purification d'une molécule prometteuse à partir de l'isolat *A. westerdijkiae* A7 et conséquences sur son utilisation en tant que BCA

Le suivi de l'activité anti-oomycète au cours de la croissance des trois isolats fongiques ; *T. simmonsii* A2, *T. asperellum* A2 et *A. westerdijkiae* A7, retenus pour leur potentiel anti-oomycète important *via* antibiose, nous a conduit à sélectionner l'isolat *A. westerdijkiae* A7 qui s'est montré particulièrement efficace en inhibant complètement la croissance mycélienne des isolats Pythiacées testés. Après caractérisation du composé actif, l'acide pénicillique s'est révélé être la molécule secrétée dans le filtrat par l'isolat *A. westerdijkiae* A7 responsable de l'activité anti-oomycète observée. La toxicité non cible de cette molécule détaillée dans le chapitre III empêche cependant toute considération de l'isolat A7 en tant que BCA et ce, malgré les résultats très prometteurs observés sur plante (voir ci-dessous).

Effet des isolats sur la croissance des plantes

Par ailleurs nos résultats présentés dans le deuxième chapitre de cette thèse, ont révélé un certain potentiel de stimulation de la croissance végétale (PGP) chez les trois isolats testés (*T. simmonsii* A2, *A. westerdijkiae* A7 et *Bacillus* sp B2) sur les plants de pommier y compris en absence de pathogènes.

Ces isolats seuls ou en combinaison ont favorisé la croissance des plants du pommier. En effet, l'application de *T. simmonsii* A2 et d'*A. westerdijkiae* A7 ont significativement augmenté le poids sec racinaire de porte-greffes. La longueur de tiges des plantes a également augmenté (énoncé dans le chapitre II). Plusieurs études ont montré les effets de stimulation de la croissance végétale des espèces bactériennes telles que les *Bacillus* spp. et les rhizobactéries (PGPR) (Idriss et al., 2004; Chowdhury et al., 2013) et des champignons tels que *Trichoderma* spp. (Van Wees et al., 2008 ; Alfredo et Aleli 2011; Schuster et Schmoll, 2010; Vinale et al., 2008; John et al., 2010; Harman et al., 2008; Harman, 2011). Cependant, à notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été rapporté pour l'espèce *A. westerdijkiae*, ni pour l'acide pénicillique d'ailleurs.

Selon plusieurs études l'acide pénicillique peut avoir des propriétés phytotoxiques (Ismail et Papenbrock, 2015), alors que nous avons observé un effet de stimulation chez les plants du pommier traités par l'isolat *A. westerdijkiae* A7, ce qui nous a amené à poser plusieurs hypothèses:

- *A. westerdijkiae* A7 ne produirait pas d'acide pénicillique en interaction avec les plants de pommier.
- L'effet phytotoxique de l'acide pénicillique dépend de la plante hôte ou de la dose.
- La production d'une ou plusieurs molécule(s) agissant sur l'acide pénicillique éliminant son effet phytotoxique.

Nous pouvons envisager des études complémentaires pour confirmer ou non l'une des hypothèses : 1/ isoler les métabolites produits par l'isolat *A. westerdijkiae* A7 pendant cette interaction, 2/ tester l'activité de l'acide pénicillique à différentes doses sur la croissance de la plante.

Étant donné que l'isolat *A. westerdijkiae* (A7) produit l'acide pénicillique et potentiellement d'autres molécules toxigènes telles que l'ochratoxine (Vega et al. 2006;

Mata et al. 2007; Noonim et al. 2008; Gil-Serna et al. 2009; Gil-Serna et al. 2015; Marino et al. 2009) nous ne pourrions pas l'utiliser en tant que BCA. Par contre, nous pouvons exploiter ses propriétés de stimulation de la croissance végétale en identifiant les molécules bénéfiques produites pendant l'interaction (*A. westerdijkiae* A7 / plante) et les utiliser en tant que biofertilisants puis tester leurs effets anti-oomycète.

Quant à l'intérêt de l'utilisation des isolats *T. simmonsii* A2 ou de *Bacillus* sp B2 en tant que PGP, des études complémentaires sont nécessaires tels que la détermination de leurs modes d'action, leur aptitude à coloniser la rhizosphère dans les conditions environnementales réelles. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de l'application des BCAs (*T. simmonsii* A2, *A. westerdijkiae* A7 ou *Bacillus* sp B2) sur l'induction de la résistance systémique du végétal (ISR) ainsi que sur les effets bénéfiques induits sur la physiologie des plantes (photosynthèse, évapotranspiration, transport des éléments nutritifs...).

Conclusions générales

À partir des résultats obtenus au cours de cette thèse, nous pouvons conclure que l'activité anti-oomycète des BCAs évalués *in vitro* représente un stade peu corrélé à l'effet protecteur *in planta* qui peut varier pendant l'interaction et qui dépend de multiples facteurs (isolats antagoniste* pathogène * plante). Par conséquent, il serait intéressant de cribler directement l'activité recherchée des BCAs *in planta* pour avoir une meilleure approximation de leur activité réelle. Néanmoins d'un point de vue pratique, cela ne serait pas très réaliste de procéder directement à des criblages *in vivo* sur du matériel végétal tels que des arbres fruitiers et plus spécialement dans le cadre d'une thèse, compte tenu des contraintes, notamment de temps et de coûts.

Une fois introduit dans un écosystème donné, un BCA n'est pas seul mais il évolue dans un environnement complexe et instable. Les conditions climatiques et environnementales peuvent être des facteurs limitant leur efficacité ou, au contraire, favorisant leur potentiel protecteur contre des phytopathogènes cibles. Un BCA peut employer différents mécanismes d'action ; soit directement (hyperparasitisme ou antibiose) ou indirectement, soit en induisant une résistance ISR chez les plantes ou en limitant la multiplication et la virulence du pathogène. Or notre crible se limitait uniquement aux BCAs agissant par antibiose. Les autres aspects restent à explorer une fois un nombre limité de BCA identifié. Ou alors d'autres cribles seraient nécessaires.

BCAs, un risque potentiel sur l'environnement ?

Les facteurs abiotiques et biotiques peuvent agir sur le métabolisme secondaire d'un BCA en influençant la production des métabolites antagonistes, des molécules stimulant la croissance végétale mais également favoriser la production de molécules potentiellement toxiques pour des organismes non-cibles. La connaissance de l'ensemble des métabolites secondaires toxiques produits par un microorganisme en toutes conditions n'existe pas. Certes, les techniques analytiques de plus en plus sensibles permettent d'avoir des inventaires très complets, mais la complexité de l'écosystème à considérer rend l'inventaire holistique inaccessible (Bardin et *al.*, 2015).

Risque de résistance des agents phytopathogènes aux BCAs

Peu d'études ont été réalisées sur la durabilité de la lutte biologique par le biais d'antagonistes ni en particulier sur le phénomène de résistance des agents phytopathogènes à ces antagonistes (revue par Bardin et *al.*, 2015). La diversité des mécanismes d'action des BCAs est un avantage évident par rapport aux produits synthétiques puisque cette diversité limite l'émergence de résistance chez les agents phytopathogènes. En effet, la plupart des fongicides de synthèse agissent sur une seule cible d'où la capacité des agents phytopathogènes à contourner leur action suite à des applications successives. A contrario, un isolat antagoniste ayant plusieurs modes d'action et donc ciblant plusieurs processus cellulaires freine l'émergence des résistances chez les agents phytopathogènes traités.

Pour l'amélioration de l'efficacité du contrôle biologique, les différents aspects concernant les BCAs doivent être pris en considération tels que leurs mécanismes d'action, les facteurs environnementaux affectant leur multiplication, leur persistance et leur efficacité, l'évaluation des risques liés à leur métabolisme secondaire ainsi que leur interaction avec d'autres microorganismes de l'écosystème étudié.

Références bibliographiques

Adebola MO, Amadi JE. 2010. Antagonistic Activities of *Paecilomyces* and *Rhizopus* Species against the Cocoa Black Pod Pathogen (*Phytophthora palmivora*). *African Scientist* **4**: 235-239.

Afzal S, Tariq S, Sultana V, Ara J, Ehteshamil-Haques. 2013. Managing the root diseases of okra with endo-root plant growth promoting *Pseudomonas* and *Trichoderma viride* associated with healthy okra roots. *Pak . J. Bot.*, **45(4)**: 1455-1460.

Ahmed A, Hasnain S. 2010. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry* **82**: 313–319.

Ahmed AS, Pérez-Sánchez C, Egea C, Candela ME. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* **48**: 58–65.

Akram A. 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non pathogènes. Thèse de doctorat, Université de Liège, 161p.

Al-Othman MR, Abd El-Aziz ARM, Mahmoud MA. 2013. Inhibitory Effect of Cinnamon Oil on Aflatoxin Produced by *Aspergillus flavus* Isolated from Shelled Hazelnuts. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **7**: 395-400.

Almassi F, Ghisalberti EL, Narbey MJ, Sivasithamparam K. 1991. New Antibiotics from Strains of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products* **54**: 396–402.

Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture : regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany* **97**: 883–893.

Alvarez F, Castro M, Príncipe A, Borioli G, Fischer S, Mori G, Jofré E. 2012. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of *sclerotinia* stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology* **112**: 159–174.

Aneja KR, Khan SA, et Aneja A. 2016. Biopesticides an eco-friendly pest management approach in agriculture : status and prospects. *Kavaka*. **47**: 145 – 154

Anonyme1, 2019.

http://www.onagri.nat.tn/uploads/Etudes/GIZ_Etude%20Pommier%20Kasserine_2014.pdf

Asaka O, Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4081–4085.

Ashoor SH, Chu FS. 1973. Inhibition of muscle aldolase by penicillic acid and patulin In vitro. *Food and Cosmetics Toxicology* **11**: 995–1000.

Auffray Y, Boutibonnes P, Lemarinier S. 1984. Filamentous forms of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) formed in the presence of genotoxic mycotoxins. *Microbiologie, aliments, nutrition* **2**, 59–67.

Babadoost M, Pavon C, Islam SZ, Tian D. 2015. *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*) of pepper and its management. *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): International Symposia on Innovative Plant Protection in Horticulture, Biosecurity, Quarantine Pests, and Market Access*: 61–66.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233–266.

Balog A, Hartel T, Loxdale HD, Wilson K. 2017. Differences in the progress of the biopesticide revolution between the EU and other major crop-growing regions. *Pest Management Science* **73**: 2203–2208.

Bando M, Hasegawa M, Tsuboi Y, Miyake Y, Shiina M, Ito M, Handa H, Nagai K, Kataoka T. 2003. The mycotoxin penicillic acid inhibits Fas ligand-induced apoptosis by blocking self-processing of caspase-8 in death-inducing signaling complex. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 5786–5793.

Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Graillet B, Siegwart M, Nicot PC. 2015. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science* **6**.

- Barea JM. 2015.** Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *Journal of soil science and plant nutrition* **15**: 261–282.
- Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE, Jacobsen BJ. 2002.** Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 289–298.
- Basak BB, Biswas DR. 2009.** Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare Pers.*) grown under two Alfisols. *Plant and Soil* **317**: 235–255.
- Beakes GW, Sekimoto S. 2008.** The Evolutionary Phylogeny of Oomycetes—Insights Gained from Studies of Holocarpic Parasites of Algae and Invertebrates. In: *Oomycete Genetics and Genomics*. John Wiley & Sons, Ltd, 1–24.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2012.** Plant growth-promoting *rhizobacteria* (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* **35**: 1044–1051.
- Benfradj N, Tounsi S, Boughalleb-M’Hamdi N. 2016.** In-vitro Evaluation of Antagonists and Fungicides in Controlling Citrus Gummosis Caused by *Phytophthora*, *Phytophthium* and *Pythium* species in Tunisia. *Microbiology Research Journal International*: 1–14.
- Benhamou N, Garand C, Goulet A. 2002.** Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4044–4060.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* **7**: 249–260.
- Benitez LB, Velho RV, Lisboa MP, Medina LF da C, Brandelli A. 2010.** Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **48**: 791–797.

- Berg G, Smalla K. 2009.** Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology* **68**: 1–13.
- Bernhoft A, Keblys M, Morrison E, Larsen HJS, Flåøyen A. 2004.** Combined effects of selected *Penicillium* mycotoxins on in vitro proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia* **158**: 441–450.
- Binder EM. 2007.** Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* **133**: 149–166.
- Bolay A. 1992a.** Les dépérissements des arbres fruitiers dus à des champignons du genre *Phytophthora* en Suisse romande et au Tessin : Sensibilité des variétés fruitières et leurs portes- greffes. *Revue Suisse Viticulture Horticulture*. 335-343.
- Bonaterra A, Badosa E, Cabrefiga J, Francés J, Montesinos E. 2012.** Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. *Trees* **26**: 215–226.
- Boughalleb N, El Mahjoub M. 2005.** Effet de la solarisation sur *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) G.M. Waterhouse responsable d'un syndrome associant nécroses racinaires et flétrissement sur piment (*Capsicum annum* L.) en Tunisie. *Tropicultura*.
- Boughalleb N, Moulahi A, El Mahjoub M. 2006.** Variability in Pathogenicity among Tunisian Isolates of *Phytophthora cactorum* as Measured by Their Ability to Cause Crown Rot on Four Apple Cultivars and MM106 Roostock. *Journal of Agronomy* **5**: 321-325.
- Boughalleb N, Souli M, Kouki C, Karbous B. 2006.** La Culture du blé: situation et estimation de l'incidence des fusarioses sur le rendement de la culture du blé dur (*Triticum Durum* L.). *Rev. Inst. Nat. Agr. Tunisie* **21**: 131–143.
- Boughalleb-M'Hamdi N, Salem IB, M'Hamdi M. 2018.** Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil-borne fungi of melon and watermelon. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **28**: 25.

Bradeen JM, Carpato D, Douches DS. 2008. Potato. Pages 117- 156 in: Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Sugar, Tuber and Fiber Crops. C. Kole and T. C. Hall, eds. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K.

Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* **71**: 139–144.

Brian PW, McGowan JG. 1945. Viridin: a Highly Fungistatic Substance Produced by *Trichoderma viride*. *Nature* **156**: 144–145.

Briones AM, Okabe S, Umemiya Y, Ramsing N-B, Reichardt W, Okuyama H. 2002. Influence of Different Cultivars on Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in the Root Environment of Rice. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3067–3075.

Budzikiewicz H. 2004. Siderophores of the *Pseudomonadaceae* sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas* spp.). In: Budzikiewicz H, Flessner T, Jautelat R, Scholz U, Winterfeldt E, Herz W, Falk H, Kirby GW, eds. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vienna: Springer Vienna, 81–237.

Burki F. 2014. The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**: a016147.

Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. *Fungi As Biocontrol Agents: Progress Problems and Potential*. CABI.

Caldeira AT, Feio SS, Arteiro JMS, Roseiro JC. 2006. Antimicrobial activity of steady-state cultures of *Bacillus* sp. CCM1 1051 against wood contaminant fungi. *Biochemical Engineering Journal* **30**: 231–236.

Cao Y, Zhang Z, Ling N, Yuan Y, Zheng X, Shen B, Shen Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils* **47**: 495–506.

Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutiérrez A, Chet I, Herrera-Estrella A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 929–935.

Cavaglieri L, Orlando J, Rodríguez MI, Chulze S, Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* **156**: 748–754.

Chakrabortti A, Li J, Liang Z-X. 2016. Complete Genome Sequence of the Filamentous Fungus *Aspergillus westerdijkiae* Reveals the Putative Biosynthetic Gene Cluster of Ochratoxin A. *Genome Announcements* **4**.

Chan PK, Hayes AW. 1981. Hepatotoxicity of the mycotoxin penicillic acid: A pharmacokinetics consideration. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **58**: A1017.

Chattapadhyay TK, Dureja P. 2006. Antifungal Activity of 4-Methyl-6-alkyl-2H-pyran-2-ones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 2129–2133.

Chaube HS, Mishra S, Varshney DS, Singh SU. 2003. Biocontrol of plant pathogens by fungal antagonists: Historical background, present status and future prospects. *Annual Review of Plant Pathology* **2**,1-42.

Chaudhary S, Kusakabe A, Melgar JC. 2016. Phytophthora infection in flooded citrus trees reduces root hydraulic conductance more than under non-flooded condition. *Scientia Horticulturae* **202**: 107–110.

Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* **107**: 558–590.

Chenari Bouket A, Arzanlou M, Tojo M, Babai-Ahari A. 2015. *Pythium kandovanense* sp. nov., a fungus-like eukaryotic micro-organism (*Stramenopila*, *Pythiales*) isolated from snow-covered ryegrass leaves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**: 2500–2506.

Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Piel J, Borriss R. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology* **140**: 27–37.

- Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZL. 2008.** Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* **47**: 180–186.
- Chet I, Inbar J, Hadar Y. 1997.** Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, So derstrom eds. *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Heidelberg: *Springer Verlag* 165–184.
- Chowdappa P, Mohan Kumar SP, Jyothi Lakshmi M, Upreti KK. 2013.** Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control* **65**: 109–117.
- Christianson DW. 2008.** Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**: 141–150.
- Ciegler A. 1972.** Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Canadian Journal of Microbiology* **18**: 631–636.
- Ciegler A, Detroy RW, Lillehoj EB. 1971.** Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. *Ajl, Samuel J. Microb Toxins*.
- Ciegler A, Mintzlaff H-J, Weisleder D, Leistner L. 1972.** Potential Production and Detoxification of Penicillic Acid in Mold-Fermented Sausage (Salami). *Applied Microbiology* **24**: 114–119.
- Claydon N, Hanson JR, Truneh A, Avent AG (School of MS. 1991.** Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry (United Kingdom)*.
- Collins DP, Jacobsen BJ. 2003.** Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* **26**: 153–161.
- Compant S, Clément C, Sessitsch, A. 2010.** Plant growth promoting rhizobacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 669-678.

- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E, Larsen J. 2016.** Ecological functions of *Trichoderma spp.* and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology* **92**: fiw036.
- Damalas CA, Koutroubas SD. 2018.** Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture* **8**: 13.
- De Souza JJ, Vieira IJC, Rodrigues-Filho E, Braz-Filho R. 2011.** Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules (Basel, Switzerland)* **16**: 10604–10618.
- Degenkolb T, von Döhren H, Fog Nielsen K, Samuels GJ, Brückner H. 2008.** Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity* **5**: 671–680.
- Degenkolb T, Fog Nielsen K, Dieckmann R, Branco-Rocha F, Chaverri P, Samuels GJ, Thrane U, von Döhren H, Vilcinskis A, Brückner H. 2015.** Peptaibol, Secondary-Metabolite, and Hydrophobin Pattern of Commercial Biocontrol Agents Formulated with Species of the *Trichoderma harzianum* Complex. *Chemistry & Biodiversity* **12**: 662–684.
- Demain AL. 2014.** Valuable Secondary Metabolites from Fungi. In: Martín J-F, García-Estrada C, Zeilinger S, eds. *Fungal Biology. Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*. New York, NY: Springer New York, 1–15.
- Deng Q, Wang W, Sun L, Wang Y, Liao J, Xu D, Liu Y, Ye R, Gooneratne R. 2017.** A sensitive method for simultaneous quantitative determination of surfactin and iturin by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**: 179–191.
- Deravel J, Krier F, Jacques P. 2014.** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *BASE*.
- Deshmukh SK, Gupta MK, Prakash V, Saxena S. 2018.** Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* **4**.
- Dickens F, Jones HE. 1961.** Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *British Journal of Cancer* **15**: 85–100.

- Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2012.** Which specificity in cooperation between phytostimulating *rhizobacteria* and plants? *Research in Microbiology* **163**: 500–510.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. 2011.** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology* **9**: 749–759.
- Duijff BJ, Gianinazzi-Pearson V, Lemanceau P. 1997.** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist* **135**: 325–334.
- Dunlop RW, Simon A, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. 1989.** An Antibiotic from *Trichoderma Koningii* Active Against Soilborne Plant Pathogens. *Journal of Natural Products* **52**: 67–74.
- Dunn AR, Milgroom MG, Meitz JC, McLeod A, Fry WE, McGrath MT, Dillard HR, Smart CD. 2010.** Population Structure and Resistance to Mefenoxam of *Phytophthora capsici* in New York State. *Plant Disease* **94**: 1461–1468.
- Durrant WE, Dong X. 2004.** Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185–209.
- Earl AM, Losick R, Kolter R. 2008.** Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **16**: 269–275.
- Edenborough MS, Herbert RB. 1988.** Naturally occurring isocyanides. *Natural Product Reports* **5**: 229–245.
- Ehrlich KC, Mack BM. 2014.** Comparison of Expression of Secondary Metabolite Biosynthesis Cluster Genes in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. oryzae*. *Toxins* **6**: 1916–1928.
- Elad Y, Stewart A. 2007.** Microbial Control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht: Springer Netherlands, 223–241.

El Hajji M, Rebuffat S, Le Doan T, Klein G, Satre M, Bodo B. 1989. Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **978**: 97–104.

Ellis MA. 1997. *Phytophthora* root and crown rot of fruit trees. The Ohio State. Site web:<http://www.caf.wvu.edu:kearneysville/disease-description/omcrown.html>

Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *Phytophthora diseases worldwide*.

Esitken A, Yildiz HE, Ercisli S, Figen Donmez M, Turan M, Gunes A. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* **124**: 62–66.

Etebarian HR, Scott ES, Wicks TJ. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as Potential Biological Control Agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 329–337.

Ezzat SM, El-Sayed EA, Abou El-Hawa MI, Ismaiel AA. 2007. Morphological and ultrastructural studies for the biological action of penicillic acid on some bacterial species. *Research Journal of Microbiology* **2**, 303–314.

FAOSAT. 2019. Agricultural Production Database : <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>

Fontem DA, Olanya OM, Tsopmbeng GR, Owona MAP. 2005. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. *Crop Protection* **24**: 449–456.

Fravel, DR. 1999. Web site for the USDA/ARS biocontrol of plant diseases laboratory <http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bioprod.htm>

Fravel DR. 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 337–359.

Fravel DR, Connick WJ, Lewis JA. 1998. Formulation Of Microorganisms To Control Plant Diseases. In: Burges HD, ed. *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Dordrecht: Springer Netherlands, 187–202.

- Fredimoses M, Zhou X, Ai W, Tian X, Yang B, Lin X, Xian J-Y, Liu Y. 2015.** Westerdijkin A, a new hydroxyphenylacetic acid derivative from deep sea fungus *Aspergillus westerdijkiae* SCSIO 05233. *Natural Product Research* **29**: 158–162.
- Frikha-Gargouri O, Ben Abdallah D, Bhar I, Tounsi S. 2017.** Antibiosis and bmy B Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Frisvad J c. 2018.** A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal* **11**: 73–100.
- Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA, Nielsen KF. 2011.** Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *PLoS ONE* **6**.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. 2004.** Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* **49**: 201–241.
- Fujii I, Watanabe A, Sankawa U, Ebizuka Y. 2001.** Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry & Biology* **8**: 189–197.
- Gachomo EW, Kotchoni SO. 2008.** The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential biocontrol agents against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. *Biotechnology* **7**, 439–447.
- Gaitatzis N, Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blöcker H, Höfle G, Müller R. 2002.** The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 13082–13090.
- García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R. 2015.** Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering* **2**: 183.
- Gardener BBM, Fravel DR. 2002.** Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. *Plant Health Progress* **3**: 17.

- Gašić S, Tanović B. 2013.** Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pesticidi i fitomedicina* **28**: 97–102.
- Gensheimer M, Mushegian A. 2004.** Chalcone isomerase family and fold: No longer unique to plants. *Protein Science* **13**: 540–544.
- Georgakopoulos DG, Fiddaman P, Leifert C, Malathrakis NE. 2002.** Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 1078–1086.
- Getha K, Vikineswary S, Wong WH, Seki T, Ward A, Goodfellow M. 2005.** Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **32**: 24–32.
- Ghanashyam C, Jain M. 2009.** Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 846–848.
- Gil-Serna J, Patiño B, Cortes L, Gonzalez-Jaen MT, Vazquez C. 2015.** *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiology* **46**: 168–175.
- Gil-Serna J, Vázquez C, Sardiñas N, González-Jaén MT, Patiño B. 2009.** Discrimination of the main Ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. *International Journal of Food Microbiology* **136**: 83–87.
- Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF. 2015.** Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research* **172**: 79–87.
- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He W-J, et al. 2015.** Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* **10**(2): e0116871.
- Gond SK, Bergen MS., Torres MS. 2015.** Endophytic *Bacillus* spp. Produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiology Research* **172**: 79–87.

Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC. 1984. Clinical Toxicology of Commercial Products., 5e éd. Baltimore (MD): Williams and Wilkins. p. II330.

Gräbsch C, Wichmann G, Loffhagen N, Herbarth O, Müller A. 2006. Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology* **21**: 111–117.

Grosch R, Dealtry S, Schreiter S, Berg G, Mendonça-Hagler L, Smalla K. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani*: complex interaction of biocontrol strains, pathogen and indigenous microbial community in the rhizosphere of lettuce shown by molecular methods. *Plant and Soil* **361**: 343–357.

Gullino ML, Kuijpers LA. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 559–581.

Guo C-J, Yeh H-H, Chiang Y-M, Sanchez JF, Chang S-L, Bruno KS, Wang CCC. 2013. Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *Journal of the American Chemical Society* **135**: 7205–7213.

Haas H. 2003. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 316–330.

Haas D, Keel C. 2003. Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* Spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 117–153.

Halo BA, Al-Yahyai RA, Al-Sadi AM. 2018. *Aspergillus terreus* Inhibits Growth and Induces Morphological Abnormalities in *Pythium aphanidermatum* and Suppresses Pythium-Induced Damping-Off of Cucumber. *Frontiers in Microbiology* **9**.

Han HS (Suncheon NU, Supanjani(McGill Univ. S-A-B (Canada) D of PS, Lee KD (McGill U. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant, Soil and Environment - UZPI (Czech Republic)*.

Hardham AR. 2007. Cell biology of plant–oomycete interactions. *Cellular Microbiology* **9**: 31–39.

Harman GE. 2011. *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* **39**: 103–108.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004a. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 43–56.

Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J. 2004b. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*® **94**: 147–153.

Harwood CR, Mouillon J-M, Pohl S, Arnau J. 2018. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews* **42**: 721–738.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, **158**: 17–25.

Hirooka T, Ishii H. 2013. Chemical control of plant diseases. *Journal of General Plant Pathology* **79**: 390–401.

Hmouni A, Hajlaoui MR, Mlaiki A. 1996. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *EPPO Bulletin* **26**: 697–705.

Hon HH. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *Journal of bacteriology & mycology* .**6**:1.

Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Taylor et Francis, London, pp 173-184.

Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS. 2000. Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*® **90**: 248–252.

- Hu JH, Hong CX, Stromberg EL, Moorman GW. 2008.** Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* **57**: 728–736.
- Hwang J, Benson DM. 2005.** Identification, Mefenoxam Sensitivity, and Compatibility Type of *Phytophthora spp.* Attacking Floriculture Crops in North Carolina. *Plant Disease* **89**: 185–190.
- Hwang SF, Gossen BD, Chang KF, Turnbull GD, Howard RJ. 2001.** Effect of seed damage and metalaxyl seed treatment on pythium seedling blight and seed yield of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* **81**: 509–517.
- Hyun I-H, Choi W. 2014.** *Phytophthora* Species, New Threats to the Plant Health in Korea. *The Plant Pathology Journal* **30**: 331–342.
- IARC. 1972.** Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human . Geva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. (Multivume e wor). Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> p. S7 69 (1987).
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P. 2003.** Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **16**: 851–858.
- Ismail AA, Papenbrock J. 2015.** Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture* **5**: 492–537.
- Jacobsen BJ. 2006.** Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents, p. 133-147, in: *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. M. J. Bailey, A. K. Lilley, T. M. Timms-Wilson and P. T. N. Spencer-Phillips, eds. Athenaeum Press, Gateshead, UK.
- Jacobsen BJ, Zidack NK, Larson BJ. 2004.** The Role of *Bacillus*-Based Biological Control Agents in Integrated Pest Management Systems: Plant Diseases. *Phytopathology*® **94**: 1272–1275.

Javan M L, Mj H, Rj S, Pahn BBS. 1995. Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* **85**: 1301–1305.

Jemil N, Manresa A, Rabanal F, Ben Ayed H, Hmidet N, Nasri M. 2017. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1060**: 374–386.

Jikali MH. 2003. La lutte biologique en phytopathologie .In: P. Le poivre (ed), Phythopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, Brussels 289-317.

Jovičić-Petrović J, Jeremić S, Vučković I, Vojnović S, Bulajić A, Raičević V, Nikodinović-Runić J. 2016. *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen *Pythium aphanidermatum*. *Archives of Biological Sciences* **68**: 279–289.

Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, et al. 2015. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **16**: 413–434.

Kang SW, Kim SW. 2004. New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. *Biotechnology Letters* **26**: 695–698.

Keller NP, Turner G, Bennett JW. 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews. Microbiology* **3**: 937–947.

Kemi. 1998. Microbiological plant protection products workshop on the scientific basis for risk assessment. National Chemicals Inspectorate of Sweden, Stockholm. Keller, N.P., Turner, G. et Bennett, J.W. 2005. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 937–947.

Khan AL, Hamayun M, Kim Y-H, Kang S-M, Lee J-H, Lee I-J. 2011. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochemistry* **46**: 440–447.

- Khan N, Mishra A, Nautiyal CS. 2012.** Paenibacillus lentimorbus B-30488r controls early blight disease in tomato by inducing host resistance associated gene expression and inhibiting *Alternaria solani*. *Biological Control* **62**: 65–74.
- Kim PI, Bai H, Bai D, Chae H, Chung S, Kim Y, Park R, Chi Y-T. 2004.** Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 942–949.
- Kim KM, Lee JY, Kim CK, Kang JS. 2009.** Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of Pharmacal Research* **32**: 711–715.
- Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang S. 2004.** Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*® **94**: 1259–1266.
- Knowles A. 2005.** New developments in crop protection product formulation. Agrow reports UK: T and F Informa UK Ltd, 153-156.
- Knowles A. 2006.** Adjuvants and additives. T and F Informa UK Ltd, Agrow reports, London. 126–129.
- Koide RT, Suomi L, Stevens CM, McCORMICK L. 1998.** Interactions between needles of *Pinus resinosa* and ectomycorrhizal fungi. *The New Phytologist* **140**: 539–547.
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, et al. 2011.** Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* **12**: R40.
- Kumar S, Singh A. 2015.** Biopesticides: Present status and the future prospects. *Journal of Fertilizers & Pesticides* **6**, e129.7, 8.
- Larkin RP, Fravel DR. 2002.** Effects of Varying Environmental Conditions on Biological Control of *Fusarium* Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **92**: 1160–1166.
- Larousse M, Galiana E. 2017.** Microbial Partnerships of Pathogenic Oomycetes. *PLoS Pathogens* **13**.

- Lavakush, Yadav J, Verma JP, Jaiswal DK, Kumar A. 2014.** Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering* **62**: 123–128.
- Leclerc G, Rebuffat S, Goulard C, Bodo B. 1998.** Directed Biosynthesis of Peptaibol Antibiotics in Two *Trichoderma* Strains. *The Journal of Antibiotics* **51**: 170–177.
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez J-S, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P. 2005.** Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4577–4584.
- Lederer W, Lorenz K-H, Seemüller E. 1992.** Studies on Antagonistic Effects of *Trichoderma* Isolates Against *Phytophthora cactorum*. *Journal of Phytopathology* **136**: 154–164.
- Leeman M, van Pelt JA, den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B. 1995.** Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *fusarium* wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 655–664.
- Lee JY, Moon SS, Hwang BK. 2003.** Isolation and Antifungal and Antioomycete Activities of Aerugine Produced by *Pseudomonas fluorescens* Strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2023–2031.
- Lee Y-K, Senthilkumar M, Kim J-H, Swarnalakshmi K, Annapurna K. 2008.** Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentimorbus* WJ5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 3057–3062.
- Lemoine J, Gaudin J. 1991.** Porte greffe du pommier et sensibilité au *Phytophthora cactorum*. *Arboriculture fruitière* **544**,19-24.
- Leng P, Zhang Z, Pan G, Zhao M. 2011.** Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* **10**: 19864–19873.

Liu J, Liu M, Wang J, Yao JM, Pan RR, Yu ZL. 2005. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 223–228.

Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek CP. 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* **178**: 6382–6385.

Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology (USA)*.

Lorito M, Hayes CK, Zoina A, Scala F, Del Sorbo G, Woo SL, Harman GE. 1994. Potential of genes and gene products from *Trichoderma sp.* and *Gliocladium sp.* for the development of biological pesticides. *Molecular Biotechnology* **2**: 209–217.

Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting *Rhizobacteria*. *Annual Review of Microbiology* **63**: 541–556.

Ma Y, Chang Z, Zhao J, Zhou M. 2008. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. *Biological Control* **44**: 24–31.

Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Hermosa R, Monte E, Gutiérrez S. 2012. Involvement of *Trichoderma Trichothecenes* in the Biocontrol Activity and Induction of Plant Defense-Related Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 4856–4868.

Marino A, Nostro A, Fiorentino C. 2009. Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *International Journal of Food Microbiology* **132**: 185–189.

Marrone PG. 2014. The Market and Potential for Biopesticides. In: ACS Symposium Series. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. American Chemical Society, 245–258.

- Martin FN, Abad ZG, Balci Y, Ivors K. 2012.** Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* **96**: 1080–1103.
- Martínez-Hidalgo P, García JM, Pozo MJ. 2015.** Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by Micromonospora strains isolated from root nodules. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Martínez-Luis S, González MC, Ulloa M, Mata R. 2005.** Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry* **66**: 1012–1016.
- Martin FN, Loper JE. 1999.** Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium spp.*: Ecology, Epidemiology, and Prospects for Biological Control. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 111–181.
- Mata MM, Taniwaki MH, Iamanaka BT, Sartori D, Oliveira AL., Furlaneto MC, Fungaro MHP. 2007.** Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 148–151.
- Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G. 1994.** Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* **100**: 221–232.
- Mavrodi OV, Walter N, Elateek S, Taylor CG, Okubara PA. 2012.** Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control* **62**: 93–102.
- Mazzola M, Andrews PK, Reganold JP, Lévesque CA. 2002.** Frequency, Virulence, and Metalaxyl Sensitivity of *Pythium spp.* Isolated from Apple Roots Under Conventional and Organic Production Systems. *Plant Disease* **86**: 669–675.
- McCarthy CGP, Fitzpatrick DA. 2017.** Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes. *mSphere* **2**.
- McMullin DR, Renaud JB, Barasubiye T, Sumarah MW, Miller JD. 2017.** Metabolites of *Trichoderma* species isolated from damp building materials. *Canadian Journal of Microbiology* **63**: 621–632.

- Mcquilken, Gemmell, Lahdenperä. 2001.** *Gliocladium catenulatum* as a Potential Biological Control Agent of Damping-off in Bedding Plants. *Journal of Phytopathology* **149**: 171–178.
- Meena KR, Kanwar SS. 2015.** Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International* **2015**: 473050.
- Mendoza García RA, Martijn ten Hoopen G, Kass DCJ, Sánchez Garita VA, Krauss U. 2003.** Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control* **27**: 210–227.
- Meng Y, Zhang Q, Ding W, Shan W. 2014.** *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology* **5**: 43–51.
- Meziane H, VAN DER Sluis I, VAN Loon LC, Höfte M, Bakker PAHM. 2005.** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* **6**: 177–185.
- Middleton JT. 1943.** The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* **20**: 1–171.
- Mikkola R, Andersson MA, Hautaniemi M, Salkinoja-Salonen MS. 2015.** Toxic indole alkaloids avrainvillamide and stephacidin B produced by a biocide tolerant indoor mold *Aspergillus westerdijkiae*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* **99**: 58–67.
- Mondol MAM, Surovy MZ, Islam MT, Schüffler A, Laatsch H. 2015.** Macrocyclic Trichothecenes from *Myrothecium roridum* Strain M10 with Motility Inhibitory and Zoosporicidal Activities against *Phytophthora nicotianae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 8777–8786.
- Monfil VO, Casas-Flores S. 2014.** Chapter 32 - Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. In: Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG, eds. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Amsterdam: Elsevier, 429–453.

Montesinos E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* **6**: 245–252.

Montesinos E, Bonaterra A, Moselio S. 2009. Pesticides, Microbial. In: Moselio S. Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, Oxford, UK. 110-120.

Montesinos E, Bonaterra A. 1996. Dose Reponse modes in biological control of Plant Pathogens : An empirical verification biological control. *Phytopathology* 86-464.

Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. 2002. Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem* **3**: 490–504.

Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, Kuniyasu T, Yamazaki M, Hamasaki T, Williams GM. 1984. Genotoxicity of a Variety of Mycotoxins in the Hepatocyte Primary Culture/DNA Repair Test Using Rat and Mouse Hepatocytes. *Cancer Research* **44**: 2918–2923.

Mougou I, Boughalleb-M'hamdi N. 2018. Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **28**: 60.

Mugnier J, Grosjean MC. 1995. PCR catalogue in plant pathology: *Pythium*. Rhône-Poulenc Agro. Lyon, France.

Muthukumar A, Eswaran A, Sangeetha G. 2011a. Induction of systemic resistance by mixtures of fungal and endophytic bacterial isolates against *Pythium aphanidermatum*. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 1933–1944.

Muthukumar A, Eswaran A, Sanjeevkumas K. 2011b. Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium Aphanidermatum* in Chilli. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**: 1598–1607.

Narayanasamy P. 2013. Mechanisms of Action of Bacterial Biological Control Agents. In: Narayanasamy P, ed. Progress in Biological Control. Biological Management of Diseases of Crops: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents. Dordrecht: Springer Netherlands, 295–429.

- Nega A. 2014.** Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **4**: 33–54–54.
- Nelson EB. 2004.** Biological control of oomycetes and fungal pathogens. In: Encyclopedia Plant and Crop Science (Ed. R.M. Goodman). Marcel Decker, USA, 137- 140.
- Neumann NKN, Stoppacher N, Zeilinger S, Degenkolb T, Brückner H, Schuhmacher R. 2015.** The Peptaibiotics Database – A Comprehensive Online Resource. *Chemistry & Biodiversity* **12**: 743–751.
- Neuweiler R, Heller W, 1998.** Anbautechnik und Sortenwahl bei Sommerhimbeeren. Schweiz. Z. Obst-Weinbau. **134**, 97-99. Nicholson, W. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 410–416.
- Ngoma L, Babalola OO, Ahmad F. 2012.** Ecophysiology of plant growth promoting bacteria *Scientific Research and Essays*, **7**(47): 4003-4013.
- Nguyen HT, Yu NH, Jeon SJ, Lee HW, Bae C-H, Yeo JH, Lee HB, Kim I-S, Park HW, Kim J-C. 2016.** Antibacterial activities of penicillic acid isolated from *Aspergillus persii* against various plant pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **62**: 488–493.
- Nihorimbere V, Ongena M, Cawoy H, Brostaux Y, Kakana P, Jourdan E, Thonart P. 2010.** Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi : reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion. *African Journal of Microbiology Research* **4**.
- Nollet LM, Rathore HS. 2015.** Biopesticides handbook. Ed. CRC PressTaylor & Francis Group. New York. USA. 281P.
- Noonim P, Mahakarnchanakul W, Nielsen KF, Frisvad JC, Samson RA. 2008.** Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology* **128**: 197–202.
- Oh S-Y, Cedergreen N, Yiannikouris A, Swamy HVLN, Karrow NA. 2017.** Assessing interactions of binary mixtures of *Penicillium* mycotoxins (PMs) by using a bovine macrophage cell line (BoMacs). *Toxicology and Applied Pharmacology* **318**: 33–40.

Olson S. 2015. An analysis of the biopesticide market now and where is going. *Outlooks Pest Manag*, **26**, 203–206.

Ongena M, Duby F, Rossignol F, Fauconnier M-L, Dommes J, Thonart P. 2004. Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **17**: 1009–1018.

Ongena M, Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* **16**: 115–125.

Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 29–38.

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny J-L, Thonart P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* **9**: 1084–1090.

Ongena M, Thonart P. 2006. Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses.

Ooka T, Shimojima Y, Akimoto T, Takeda I, Senoh S, Abe J. 1966. A New Antibacterial Peptide ‘Suzukacillin’. *Agricultural and Biological Chemistry* **30**: 700–702.

Ordentlich A, Wiesman Z, Gottlieb HE, Cojocar M, Chet I. 1992. Inhibitory furanone produced by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* **31**: 485–486.

Pal KK, McSpadden Gardener B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1-25.

Pankhurst CE, Lynch JM. 2005. Biocontrol of soilborne plant diseases. Encyclopedia of soils in the environment. Elsevier, pp. 129-136. *Encyclopedia of Soils in the Environment* **129-136**.

Papavizas GC, Lewis JA. 1989. Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse. *Plant Pathology* **38**: 277–286.

- Park MS, Jang KS, Choi YH, Kim J-C, Choi GJ. 2013.** Simple Mass-screening Methods for Resistance of Tomato to *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Horticultural Science & Technology* **31**: 110–116.
- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM, DiLeo MV. 2016.** From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Parra G, Ristaino JB. 2001.** Resistance to Mefenoxam and Metalaxyl Among Field Isolates of *Phytophthora capsici* Causing *Phytophthora* Blight of Bell Pepper. *Plant Disease* **85**: 1069–1075.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE. 2013.** Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 6548–6553.
- Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. 2011.** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 187–193.
- Plaats-Niterink AJ van der. 1981.** *Monograph of the genus Pythium*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Pratt BH, Sedgley JH, Heather WA, Shepherd CJ. 1972.** Oospore Production in *Phytophthora Cinnamomi* in the Presence of *Trichoderma Koningii*. *Australian Journal of Biological Sciences* **25**: 861–864.
- Preecha C, Sadowsky MJ, Prathuangwong S. 2010.** Lipopeptide surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is required for biocontrol efficacy against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Kasetsart Journal - Natural Science* **44**: 84–99.
- Press CM, Loper JE, Klopper JW. 2001.** Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* **91**: 593–598.
- Pscheidt JW. 2015.** Diagnosis and Control of *Phytophthora* Diseases. IN Pscheidt JW, Ocamo CM. (Senior Eds.), *Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook* (383).
- Punja ZK, Utkhede RS. 2003.** Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases.

Trends in Biotechnology **21**: 400–407.

Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 537–547.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* **321**: 341–361.

Rahmeni R. 2007. Caractéristiques du développement végétatif et génératif de pommier (*Malus x domestica* Borkh.) Cas de quatre variétés : ‘Anna’, ‘Lorka’ ,’Zina’ et ‘Aziza’. Memoire de Master à l’ISA-chott Mariem.78.

Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO, Andersen JB, Koch B, Larsen TO, Hentzer M, et al. 2005. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology (Reading, England)* **151**: 1325–1340.

Ravensberg WJ. 2011. *A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods*. Springer Netherlands.

Reddy KRN, Raghavender CR, Reddy BN, Salleh B. 2010. Biological control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B1 production in sorghum grains. *African Journal of Biotechnology* **9**: 4247–4250.

Reinhold-Hurek B, Hurek T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* **6**: 139–144.

Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* **7**: 89–123.

Reiss J. 1979. Inhibitory action of the mycotoxins patulin and penicillic acid on urease. *Food and Cosmetics Toxicology* **17**: 145–146.

Rettinassababady C, Jeyalakshmi C. 2014. Bio-Fungicides: The Best Alternative for Sustainable Food Security and Ecosystem. In: Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK, Raghuwanshi R, eds. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. New Delhi: Springer India, 401–411.

Rhodes DJ. 1993. Formulation of biological control agents. In: Jones DG, ed. *Exploitation of Microorganisms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 411–439.

Rhouma A, Ben Salem I, M’Hamdi M, Boughalleb-M’Hamdi N. 2018. Antagonistic potential of certain soilborne fungal bioagents against *Monosporascus* root rot and vine decline of watermelon and promotion of its growth. *Novel Research in Microbiology Journal* **2**: 85–100.

Robinson JP, Harris SA, Juniper BE. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (*Rosaceae*) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution* **226**: 35–58.

Rodríguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* **110**: 1177–1186.

Roiger DJ, Jeffers SN. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology* **81**: 910–917.

Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening J-W, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-García A. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **20**: 430–440.

Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD. 2005. *Tricalcium* phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 217–222.

Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW. 2004. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **134**: 1017–1026.

Sanchez JF, Somoza AD, Keller NP, Wang CCC. 2012. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports* **29**: 351–371.

Sang MK, Kim KD. 2012. The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. *Journal of Applied Microbiology* **113**: 383–398.

- Sang MK, Shrestha A, Kim D-Y, Park K, Pak CH, Kim KD. 2013.** Biocontrol of *Phytophthora* Blight and Anthracnose in Pepper by Sequentially Selected Antagonistic *Rhizobacteria* against *Phytophthora capsici*. *The Plant Pathology Journal* **29**: 154–167.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda M del C, 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* **22**: 855–872.
- Sassa T, Hayakari S, Ikeda M, Miura Y. 1971.** Plant Growth Inhibitors Produced by Fungi. *Agricultural and Biological Chemistry* **35**: 2130–2131.
- Saville A, Graham K, Grünwald NJ, Myers K, Fry WE, Ristaino JB. 2015.** Fungicide Sensitivity of U.S. Genotypes of *Phytophthora infestans* to Six Oomycete-Targeted Compounds. *Plant Disease* **99**: 659–666.
- Schena L, Ippolito A, Zahavi T, Cohen L, Droby S. 2000.** Molecular Approaches to Assist the Screening and Monitoring of Postharvest Biocontrol Yeasts. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 681–691.
- Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann H-W, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuemann J, Martin K, Hertweck C, Brakhage AA. 2009.** Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 14558–14563.
- Schuster A, Schmoll M. 2010.** Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 787–799.
- Segarra G, Casanova E, Avilés M, Trillas I. 2010.** *Trichoderma asperellum* Strain T34 Controls *Fusarium* Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron. *Microbial Ecology* **59**: 141–149.
- Selvakumar R, Srivastava KD. 2000.** Management of spot blotch of wheat using biocontrol agent. National conference on swadeshi Vigyan.held at new delhi.p289
- Shafi J, Tian H, Ji M. 2017.** *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **31**: 446–459.

Shaikh SS, Sayyed RZ. 2015. Role of Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria* and Their Formulation in Biocontrol of Plant Diseases. In: Arora NK, ed. *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. New Delhi: Springer India, 337–351.

Shaikh SS, Sayyed RZ, Reddy MS. 2016. Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria*: An Eco-friendly Approach for Sustainable Agroecosystem. In: Hakeem KR, Akhtar MS, Abdullah SNA, eds. *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*. Cham: Springer International Publishing, 181–201.

Shaw S, Cocq KL, Paszkiewicz K, Moore K, Winsbury R, Zabala M de T, Studholme DJ, Salmon D, Thornton CR, Grant MR. 2016. Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular Plant Pathology* **17**: 1425–1441.

Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**: 285–295.

Sheng XF, He LY. 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 66–72.

Shen S-S, Park O-H, Lee S-M, Park C-S. 2002. In vitro and In vivo Activities of a Biocontrol Agent, *Serratia plymuthica* A21-4, Against *Phytophthora capsici*. *The Plant Pathology Journal* **18**: 221–224.

Shishkoff N, McGrath MT. 2002. AQ10 Biofungicide Combined with Chemical Fungicides or AddQ Spray Adjuvant for Control of Cucurbit Powdery Mildew in Detached Leaf Culture. *Plant Disease* **86**: 915–918.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 21–43.

Shrestha A, Park SH, Shrestha B, Kim K, Chae JC, Lee KJ. 2014. Biological Control of Oomycetous Plant Pathogens: A Review. *Nepal Journal of Science and Technology* **15**: 157–166.

Shukla R, Shukla A. 2012. Market potential for biopesticides: a green product for agricultural applications. *International Journal of Management Research and Review* **2**(1): 91-99.

Singh A, Islam MN. 2010. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae* *International Journal of Experimental Agriculture* **1**(1), 20-25.

Singh HB, Singh BP, Singh SP, Sarma BK. 2012. Exploring different avenues of *Trichoderma* as a potent biofortified and plant growth promoting candidate—an overview. *Review of Plant Pathology* **5**:315–426.

Singh A, Jain A, Sarma BK, Upadhyay RS, Singh HB. 2014. Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection. *Microbiological Research* **169**: 353–360.

Smith VL, Wilcox WF, Harman GE. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology (USA)*.

Souli M, 2008. Le dépérissement du pommier (*Malus communis*) en Tunisie : importance et identification des Pythiacées incriminées dans ce problème. Mémoire de Master à l'ISA-Chott Mariem.3-23.

Souli M, Boughalleb N, Abad-Campos P, Alvarez LA, Perez-Sierra A, Armengol J, Garcia-Jiménez J, Romdhani MS. 2011a. Diversity of *Pythium* community infecting crown and roots apple in Tunisia. *Research in plant biology*, **1**(4), 16-22.

Souli M, Boughalleb N, Abad-Campos P, Alvarez LA, Pérez-Sierra A, Armengol J, García-Jiménez J. 2011b. First Report of *Pythium indigoferae* and *P. irregulare* Associated to Apple Trees Decline in Tunisia. *Journal of Phytopathology* **159**: 352–357.

Souli M, Abad-Campus P, Pérez-Sierra A, Fattouch S, Armengol J, Boughalleb-M'Hamdi* N. 2014. Etiology of apple tree dieback in Tunisia and abiotic factors associated with the disease. *African Journal of Microbiology Research* **8**: 2272–2281.

Souza CG, Martins FICC, Zocolo GJ, Figueiredo JEF, Canuto KM, de Brito ES. 2018. Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **410**: 6827–6836.

Speckbacher V, Zeilinger S. 2018. Secondary Metabolites of Mycoparasitic Fungi. *Secondary Metabolites - Sources and Applications*.

Stewart A, Ohkura M, McLean K. 2010. Targeted screening for microbial bioactivity. In: New Zealand Plant Protection Society Incorporated.

Stewart A. 2012. Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology* **30**: 250–258.

Strieker M, Tanović A, Marahiel MA. 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **20**: 234–240.

Sumi CD, Yang BW, Yeo I-C, Hahm YT. 2014. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology* **61**: 93–103.

Takors R. 2012. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. *Journal of Biotechnology* **160**: 3–9.

Tan Z, Lin B, Zhang R. 2013. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus* **2**: 543.

Tapi A, Chollet-Imbert M, Scherens B, Jacques P. 2010. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1521–1531.

Tashiro F, Hiral K, Ueno Y. 1979. Inhibitory effects of carcinogenic mycotoxins on deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase and ribonuclease H. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 191–196.

Thines M, Kamoun S. 2010. Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 427–433.

Thomidis T, Elena K. 2001. Effects of Metalaxyl, Fosetyl-Al, Dimethomorph and Cymoxanil on *Phytophthora cactorum* of Peach Tree. *Journal of Phytopathology* **149**: 97–101.

Timmusk S, van West, P, Gow CN, Huffstutler RP. 2009. Biofilm forming *Paenibacillus polymyxa* antagonizes oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 1473–1481.

- Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A, Thonart P. 2004.** Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 1151–1160.
- Türkölmez Ş, Derviş S. 2017.** Activity of metalaxyl-M+mancozeb, fosetyl-Al, and phosphorous acid against *Phytophthora* crown and root rot of apricot and cherry caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Protection Science* **53**: 216–225.
- Uchida R, Imasato R, Yamaguchi Y, Masuma R, Shiomi K, Tomoda H, Ōmura S. 2005.** New Insecticidal Antibiotics, Hydroxyfungerins A and B, Produced by *Metarhizium sp.* FKI-1079. *The Journal of Antibiotics* **58**: 804–809.
- Umeda M, Tsutsui T, Saito M. 1977.** Mutagenicity and inducibility of dna single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *GANN Japanese Journal of Cancer Research* **68**: 619–625.
- Vacheron J, Moënne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D, Prigent-Combaret C. 2016.** Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only Few Plant-Beneficial Properties Are Favored in the Maize Rhizosphere. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Van Dijk K, Nelson EB. 2000.** Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5340–5347.
- Van Loon LC, Bakker PAHM. 2006.** Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppression by Rhizobacteria. In: Siddiqui ZA, ed. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Dordrecht: Springer Netherlands, 39–66.
- Van Peer R, Schippers B. 1992.** Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas sp.* strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**: 129.
- Van Wees SC, Pieterse CM, Trijssenaar A, Van 't Westende YA, Hartog F, Van Loon LC. 1997.** Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **10**: 716–724.

- Van West P, Appiah AA, Gow NAR. 2003.** Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**: 99–113.
- Vargas WA, Mukherjee PK, Laughlin D, Wiest A, Moran-Diez ME, Kenerley CM. 2014.** Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology (Reading, England)* **160**: 2319–2330.
- Vega FE, Posada F, Gianfagna TJ, Chaves FC, Peterson SW. 2006.** An insect parasitoid carrying an ochratoxin producing fungus. *Die Naturwissenschaften* **93**: 297–299.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* **37**: 1–20.
- Vesely D, Vesela D (Ceskoslovenska AV. 1991.** The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. *Veterinarni Medicina - UVTIZ (CSFR)*.
- Vessey JK. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571–586.
- Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos N, Weekers F, Kevers C, Thonart P, et al. 2004.** Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology* **27**: 243–258.
- Vey A, Hoagland RE, Butt TM. 2001.** Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, Butt, TM., C Jackson and N. Magan (Eds.). CAB International, Bristol, 311-346.
- Vilches Ferrón MA, Casas López JL, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Chisti Y. 2005.** Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**: 123–125.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos S de los. 2018.** The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* **36**: 95–130.

- Vinale F, Flematti G, Sivasithamparam K, Lorito M, Marra R, Skelton BW, Ghisalberti EL. 2009.** Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products* **72**: 2032–2035.
- Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M, Sivasithamparam K. 2006.** Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 143–148.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL, Lorito M. 2008a.** A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**: 80–86.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. 2008b.** *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1–10.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Ruocco M, Woo S, Lorito M. 2012.** *Trichoderma* Secondary Metabolites that Affect Plant Metabolism. *Natural Product Communications* **7**: 1934578X1200701133.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Woo SL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, et al. 2014.** *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal* **8**.
- Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. 2014.** Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology* **78**: 1–61.
- Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C. 2007.** The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* **8**: 737–746.
- Von Döhren H. 2004.** Biochemistry and General Genetics of Nonribosomal Peptide Synthetases in Fungi. In: Brakhage AA, ed. *Advances in Biochemical Engineering. Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases: -/-*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 217–264.
- Waghunde RR, Shelake RM, Sabalpara AN. 2016.** *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research* **11(22)**, 1952-1965.

Walsh CT, Fischbach MA. 2010. Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 2469–2493.

Wang Y, Zheng J, Liu P, Wang W, Zhu W. 2011. Three New Compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 Grown in a High Salt Medium. *Marine Drugs* **9**: 1368–1378.

Wang C-J, Yang W, Wang C, Gu C, Niu D-D, Liu H-X, Wang Y-P, Guo J-H. 2012. Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting *Rhizobacterium* Strains. *PLoS ONE* **7**.

Wani SA, Chand S, Ali T. 2013. Potential Use of *Azotobacter Chroococcum* in Crop Production: An Overview. *Current Agriculture Research Journal* **1**: 35–38.

Waterhouse GM. 1968. The genus *Pythium* pringsheim. *Mycological Papers* **110**: 1-50.

Wawrzyn GT, Bloch SE, Schmidt-Dannert C. 2012. Discovery and characterization of terpenoid biosynthetic pathways of fungi. *Methods in Enzymology* **515**: 83–105.

Werner S, Steiner U, Becher R, Kortekamp A, Zyprian E, Deising HB. 2002. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS microbiology letters* **208**: 169–173.

Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**: 487–511.

Wiest A, Grzegorski D, Xu B-W, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, Bodo B, Kenerley C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 20862–20868.

Williams P. 2002. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **6**: 257–274.

Woodruff HB. 2014. Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 2–8.

- Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito M. 2014.** Trichoderma-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The Open Mycology Journal* **8**.
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M. 2006.** The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology* **96**: 181–185.
- Xu X-M, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ. 2011.** Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology* **101**: 1024–1031.
- Xu H-M, Rong Y-J, Zhao M-X, Song B, Chi Z-M. 2014.** Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 127–136.
- Yamaji K, Fukushi Y, Hashidoko Y, Tahara S. 2005.** *Penicillium frequentans* isolated from *Picea glehnii* seedling roots as a possible biological control agent against damping-off. *Ecological Research* **20**: 103–107.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I. 2003.** Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7343–7353.
- Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A. 2001.** Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. *Phytopathology* **91**: 181–187.
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL. 2002.** Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 955–963.
- Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PK. 2016.** Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* **30**: 74–90.

Zhang Q, Li H-Q, Zong S-C, Gao J-M, Zhang A-L. 2012. Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **12**: 127–148.

Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M. 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**: 5951–5960.

Ziegler J, Facchini PJ. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 735–769.

Annexes

RMN (^1H , ^{13}C) de la molécule active MA

Les données spectrales RMN (^1H , ^{13}C) de la molécule active MA ainsi que leurs interprétations sont présentés en Annexe

- **Fig 26.** Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 5,47 (m, 1H, H6) ; 5,22 (m, 1H, H6) ; 5,13 (s, 1H, H2) ; 3,91 (s, 3H, H8) ; 3,38 (s, H échangeable, 1H, OH) ; 1,79 (s, 3H, H7).
- **Fig 27.** Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 178,6 (C3), 169,9 (C1), 139,8 (C5), 116,4 (C6), 102,4 (C4), 89,4 (C2), 59,8 (C8), 17,6 (C7).
- HR ESIMS de $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_4$: calculé m/z 171,0652 $[\text{M}+\text{H}]^+$; trouvé m/z 171,0626 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

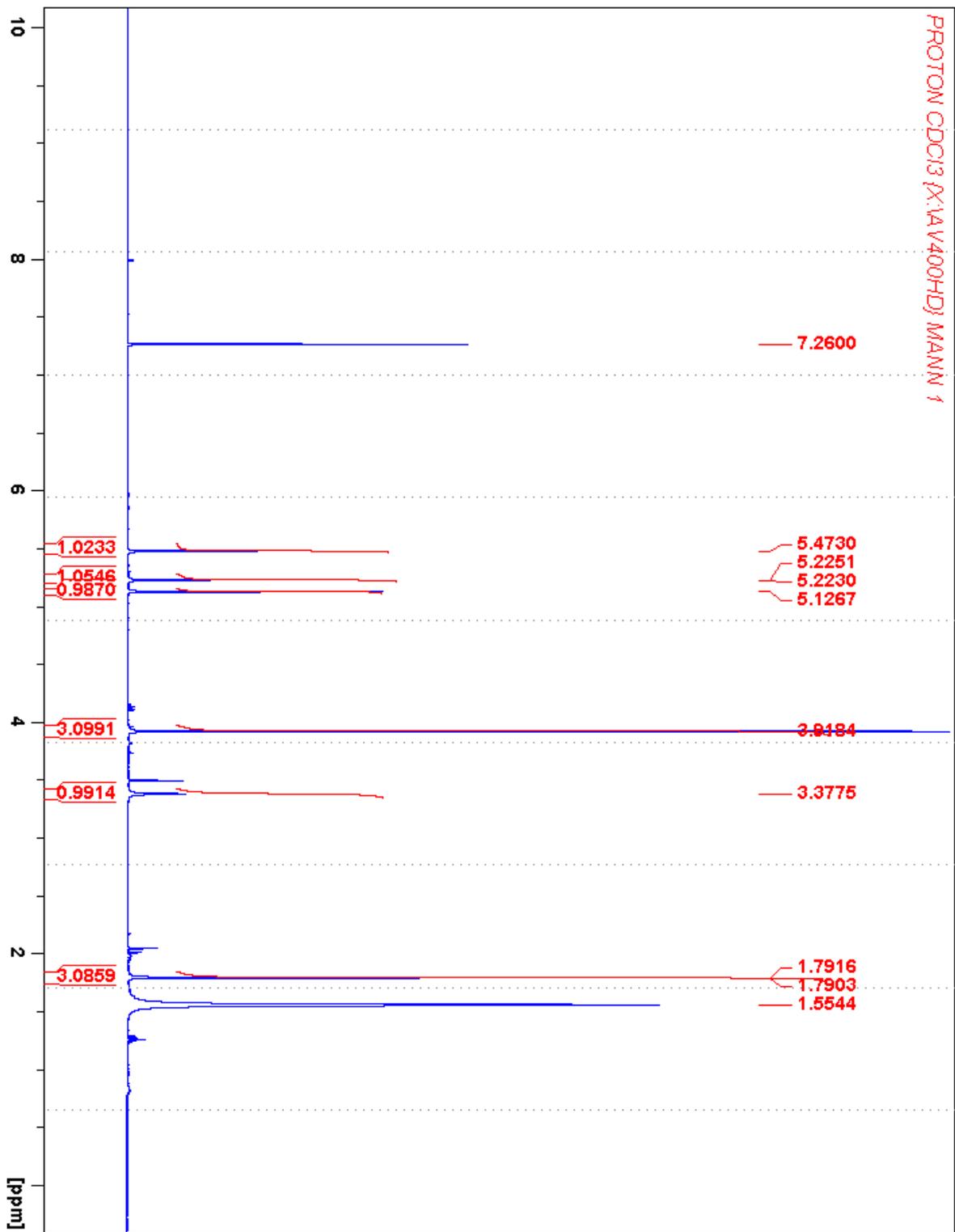


Figure 26. Spectre RMN ^1H

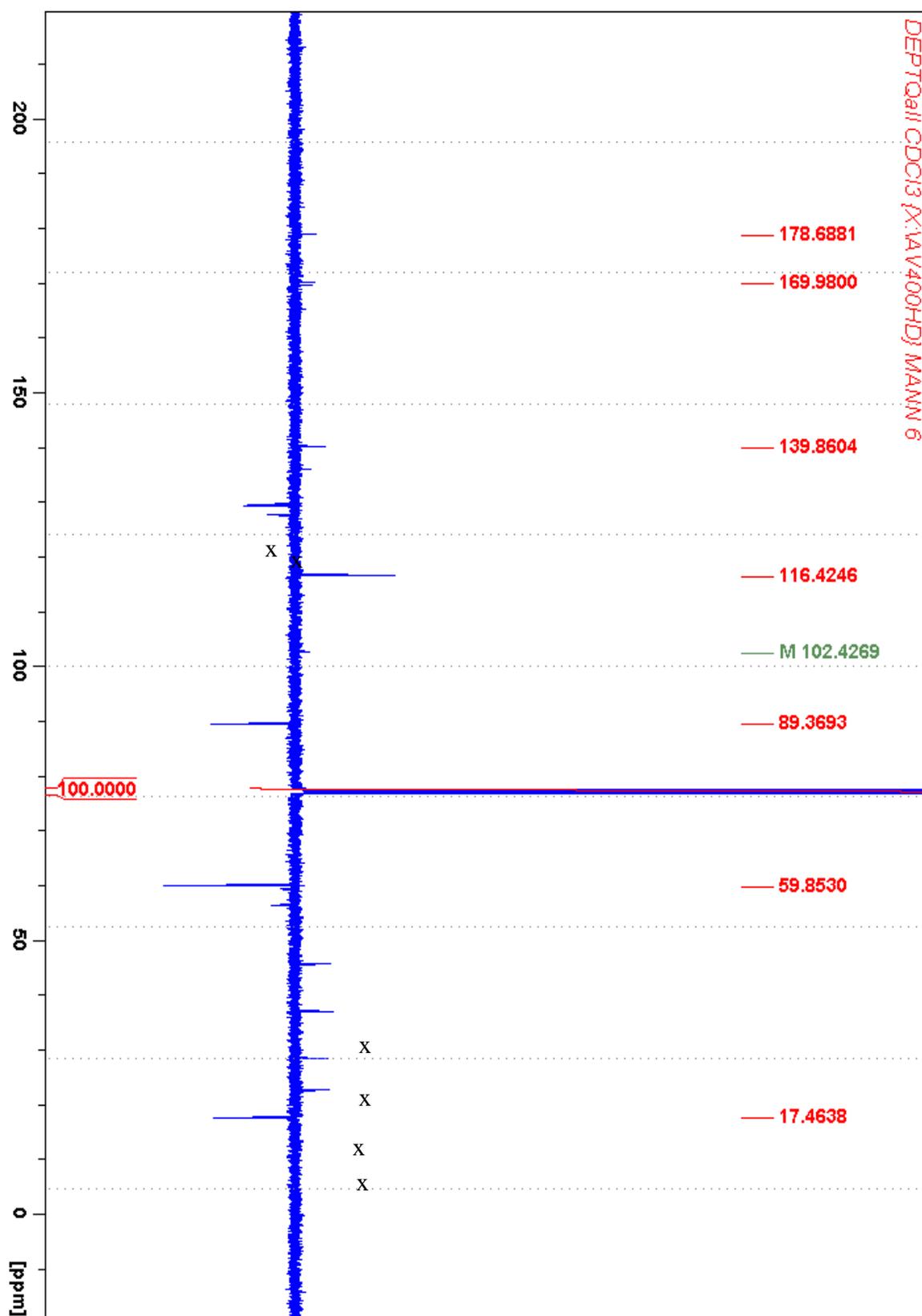


Figure 27. Spectre RMN ^{13}C

Titre : Gestion de la maladie de dépérissement du pommier : criblage *in vitro* et *in planta* des activités protectrices d'une collection de microorganismes contre les Pythiacées et caractérisation chimique du principal actif produit par l'isolat *A. westerdijkiae* A7

Mots clés : dépérissement du pommier, anti-oomycète, interaction microbienne, croissance des plantes, molécule bioactive, BCAs fongiques et bactériens.

Résumé : Le dépérissement du pommier est une maladie tellurique causée par plusieurs espèces Pythiacée. Il est responsable de dommages graves et de pertes d'arbres dans de nombreux vergers en Tunisie. Comme la lutte chimique contre cette maladie pose des problèmes éco toxicologiques et les moyens prophylactiques ont des efficacités limitées, d'autres moyens de lutte sont activement recherchés. L'objectif de cette thèse était d'identifier un nouvel agent de lutte biologique contre les oomycètes responsables de cette maladie à partir d'une collection d'isolats fongiques et bactériens Tunisiens comme alternative au contrôle chimique. Les isolats fongiques étudiés appartenaient aux genres *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium* spp., les isolats bactériens au genre *Bacillus* spp. clade *subtilis*.

Les isolats fongiques ont fortement inhibé la croissance *in vitro* des Pythiacées (> 40%) par rapport aux isolats bactériens ; en particulier, les filtrats de culture des isolats *A. westerdijkiae* A7 et de *T. simmonsii* A2. L'évaluation de l'activité préventive et curative contre les Pythiacées sur des porte-greffes du pommier de ces deux isolats fongiques et de la souche *Bacillus* B2 a montré que *T. simmonsii* A2 était le plus efficace lorsqu'il était appliqué à titre préventif. De même, la combinaison de la souche *Bacillus* B2 et de l'isolat *A. westerdijkiae* A7 a induit une bonne protection contre les Pythiacées en préventif. La combinaison des isolats *T. simmonsii* A2 et *A. westerdijkiae* A7 a entraîné une meilleure protection en traitement curatif, alors que la combinaison des trois isolats ensemble réduisait fortement l'activité protectrice.

Notre étude révèle le potentiel des isolats Tunisiens, seuls ou en combinaison, en tant qu'agents de lutte biologique contre le dépérissement du pommier ainsi qu'un effet bénéfique supplémentaire sur la croissance végétale observé au niveau des racines et de la longueur des tiges.

Ainsi, nous avons sélectionné les meilleurs candidats agissant par antibiose pour l'identification des principaux agents actifs responsables de l'activité anti-oomycète. L'isolat *A. westerdijkiae* A7 a été retenu avec 100% d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de Pythiacées testés. Plusieurs étapes de purification successives du filtrat de culture ont permis d'identifier l'acide pénicillique (acide 3-méthoxy-5-méthyl-4-oxo-2,5-hexadiénoïque) en tant que principale molécule responsable de l'inhibition la croissance mycélienne des Pythiacées testées. Étant donné que l'acide pénicillique possède des propriétés toxiques pour la santé humaine et animale, l'isolat *A. westerdijkiae* A7 ne pourra pas être utilisé en tant que BCA puisqu'il produit cette mycotoxine malgré nos résultats prometteurs *in planta*.

L'ensemble de ces travaux montre le potentiel anti-oomycète des micro-organismes *in vitro* qui peut différer de l'activité protectrice contre les Pythiacées *in planta*. Ils révèlent également la nécessité de caractériser l'ingrédient actif pour les études de toxicité nécessaire au développement d'un produit de bio-contrôle.

Title : Management of apple dieback disease: *in vitro* and *in planta* screening of protective activities of a collection of microorganisms against Pythiaceae and chemical characterization of the main active ingredient produced by the isolate *A. westerdijkiae* A7

Keywords : apple dieback, anti-oomycete, microbial interaction, plant growth, bioactive molecule, fungal and bacterial BCAs

Abstract :

Apple dieback is a telluric disease caused by several Pythiaceae species. It is responsible for serious damage and loss of trees in many orchards in Tunisia. As the chemical control of this disease poses eco-toxicological problems and the prophylactic means have limited effectiveness, other means of fight are actively sought. The objective of this thesis was to identify a new biological control agent against oomycetes responsible for this disease from a collection of Tunisian fungal and bacterial isolates as an alternative to chemical control. The fungal isolates studied belonged to the genera *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Penicillium* spp., The bacterial isolates to the genus *Bacillus* spp. clade *subtilis*.

Fungal isolates strongly inhibited the growth of Pythiaceae *in vitro* (> 40%) compared to bacterial isolates; in particular, the culture filtrates of isolates *A. westerdijkiae* A7 and *T. simmonsii* A2. The evaluation of the preventive and curative activity against Pythiaceae on apple rootstocks of these two fungal isolates and of the *Bacillus* B2 strain showed that *T. simmonsii* A2 was the most effective when applied preventively. Likewise, the combination of the *Bacillus* B2 strain and the *A. westerdijkiae* A7 isolate induced good protection against Pythiaceae as a preventive measure. The combination of the *T. simmonsii* A2 and *A. westerdijkiae* A7 isolates resulted in better protection in curative therapy, while the combination of the three isolates together greatly reduced the protective activity.

Our study reveals the potential of Tunisian isolates, alone or in combination, as biological control agents against apple dieback as well as an additional beneficial effect on plant growth observed at the level of the roots and the length of the stems.

Thus, we have selected the best candidates acting by antibiosis for the identification of the main active agents responsible for anti-oomycete activity. The *A. westerdijkiae* A7 isolate was retained with 100% inhibition of mycelial growth of the Pythiaceae isolates tested. Several successive purification steps of the culture filtrate made it possible to identify penicillic acid (3-methoxy-5-methyl-4-oxo-2,5-hexadienoic acid) as the main molecule responsible for inhibiting growth mycelia of the Pythiaceae tested. Since penicillic acid has toxic properties for human and animal health, isolate *A. westerdijkiae* A7 cannot be used as BCA since it produces this mycotoxin despite our promising results *in planta*.

All of this work shows the anti-oomycete potential of microorganisms *in vitro*, which may differ from the protective activity against Pythiaceae *in planta*. They also reveal the need to characterize the active molecule for the toxicity studies necessary for the development of a biocontrol product.