

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE GEMBLOUX AGRO-BIO TECH

Potentiel de *Bacillus amyloliquefaciens* pour lutter contre les maladies fongiques endémiques du maïs au sud Kivu: efficacité et mode d'action

Parent ZIHALIRWA KULIMUSHI

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : Marc Ongena
Co-promoteur : Philipe Thonart

Gembloux, Août 2017

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de ladite loi et de des modifications ultérieures

Members of the jury

Mme Marie-Laure FAUCONNIER (présidente), ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

M. Marc ONGENA (promoteur), ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

M. Philippe THONART (co-promoteur), ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

M. Georges LOGNAY, ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

Mme Magali DELEU, ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

M. Philippe JACQUES, ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

M. Frank DELVIGNE, ULg, Gbx AGRO-BIO TECH

M. François KRIER (Université de Lille, France)

Ce travail a été financé par **Bread for the World – German Protestant Church Development Service**

RESUME

Les rhizobactéries du genre *Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum* ont le potentiel de produire une diversité des molécules antimicrobiennes dont les lipopeptides cycliques (CLPs) contribuent largement à leur efficacité dans la lutte biologique contre nombreux agents pathogènes grâce à divers mécanismes, mais il manque encore d'information sur l'impact d'autres microbes du sol dans l'expression de ces molécules. Il est donc crucial d'évaluer avec précision si *Bacillus spp* est en mesure de percevoir le signal moléculaire émis par un pathogène et moduler la production de certains antibiotiques de nature lipopeptidique dans l'interaction tripartite rhizobactérie-plante-pathogène.

Sur le plan appliqué, les travaux de recherche de cette thèse se placent premièrement dans le contexte du développement des produits biologiques à base de microorganismes utilisables comme bio pesticides pour contribuer à résoudre les problèmes posés par les maladies des plantes en milieu tropical. Ces biopesticides microbiens peuvent dans certains cas offrir une solution aux méfaits des pesticides chimiques de par leur ubiquité naturelle dans les écosystèmes, leur dissémination facile, la diversité de spécificité de leur action et aussi leur faible persistance dans l'environnement ou soit si ces derniers sont trop couteux pour que l'agriculteur puisse s'en fournir. Dans ce contexte, nous avons ciblé la problématique des ravages causés par des champignons phytopathogènes endémiques sur le maïs dans le Sud-Kivu à l'Est de la DR Congo. Dans la première phase une série de tests réalisée au laboratoire ont montré le potentiel de diverses souches de l'espèce *B. amyloliquefaciens/subtilis* à inhiber le développement de ces pathogènes, mais les résultats ont permis de sélectionner une souche de *B. amyloliquefaciens* S499 particulièrement efficace. Cette efficacité était corrélée à une sécrétion importante de trois principales familles des lipopeptides et leurs homologues à savoir les surfactines, les fengycines et les iturines ainsi que la colonisation des racines de maïs par cette bactérie. A partir de ces résultats, des expériences au champ dans deux zones agro-écologiques du Sud-Kivu bien distinctes, caractérisées par des conditions climatiques et pédo-environnementales différentes ont été réalisées. Les résultats obtenus ont mis en lumière le réel potentiel de S499 à protéger le maïs contre les infections fongiques mais aussi en terme de promotion de croissance et de rendement en épis associé à la solubilisation du phosphore et la production des hormones de croissance. Dans une deuxième partie et à un niveau plus fondamental, certaines données obtenues en comparaison avec les mutants ont suggéré que la production de certains antibiotiques de nature lipopeptidique, particulièrement les fengycines, par S499 était responsable de l'activité inhibitrice vis-à-vis des champignons phytopathogènes même à des faibles concentrations et il apparaît que la bactérie soit capable de « percevoir » la présence d'au moins un de ces pathogènes, *R. variabilis* et que suite à cette perception, elle augmente sa production de ce lipopeptide ainsi que les gènes Fen intervenant dans la biosynthèse de fengycines après analyse à la fois par LC-MS et RT-qPCR. La stimulation de la surproduction des fengycines en présence de *R. variabilis*

a été aussi observée pour d'autres souches comme FZB42 bien que plus faible en amplitude, mais ne semble pas s'appliquer à tous les membres de cette espèce puisque aucune stimulation n'a été détectée dans le cas de la souche QST713. D'une façon globale *Bacillus* S499 est prometteur pour être exploité comme biopesticide en milieu tropical mais la base moléculaire du phénomène en ce qui concerne la perception des champignons et la transduction du signal en aval conduisant à une synthèse de CLP régulée à la hausse est encore totalement inconnue. D'autres investigations sont encore nécessaires.

SUMMARY

Rhizobacteria genus of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* have the potential to produce a diversity of antimicrobial molecules whose cyclic lipopeptides (CLPs) contribute significantly to their effectiveness in the biological control of many pathogens through various mechanisms, but there is still a lack of information on the impact of other soil microbes in the expression of these molecules. It is therefore crucial to assess accurately whether *Bacillus spp* is able to perceive the molecular signal emitted by a pathogen and modulate the production of certain lipopeptide antibiotics in the tripartite rhizobacteria-plant-pathogen interaction. The research work of this thesis is placed first in the context of the development of biological products based on microorganisms that can be used as bio pesticides to help solve the problems posed by plant diseases in tropical environments.

These microbial biopesticides may in some cases offer a solution to the harmful effects of chemical plant protection products due to their natural ubiquity in ecosystems, their wide variety, easy dispersal, their diversity of action specificity and also their low persistence in the environment or if they are too expensive for the farmer to get. These microbial biopesticides may in some cases offer a solution to chemical pesticides due to their natural ubiquity in ecosystems, their easy release, the diversity specificity of their action and also their low persistence in the environment or whether they are too expensive for the farmer. In this context, we have targeted the problem of the ravages caused by endemic phytopathogenic fungi on maize in South Kivu to the east of DR Congo. In the first phase a series of tests carried out in the laboratory showed the potential of various strains of the *B. amyloliquefaciens* / *subtilis* species to inhibit the development of these pathogens, but the results made it possible to select a particularly effective strain of *B. amyloliquefaciens* S499. This efficacy was correlated with a large secretion of three main families of lipopeptides and their counterparts, namely surfactins, fengycins and iturins, as well as the colonization of corn roots by these bacteria.

From these results, field experiments in two distinct agro-ecological zones of South Kivu, characterized by different climatic and pedo-environmental conditions, were carried. The data obtained highlighted the real potential of S499 to protect corn against fungal infections but also in terms of promoting growth and ears yield associated with the phosphorus solubilisation and the production of plant growth

hormones. In a second part and at a more fundamental level, some data obtained in comparison with the mutants have suggested that the production of certain lipopeptides antibiotics, particularly fengycins by S499, was responsible for the inhibitory activity towards fungi phytopathogens even at low concentrations and it appears that this bacteria is capable of "perceiving" the presence of at least one of these pathogens, *R. variabilis* and that following this perception it increases the production of this lipopeptide as well as the Fen genes involved in biosynthesis of fengycins after LC-MS and RT-qPCR analysis. The stimulation overproduction of fengycins in the presence of *R. variabilis* has also been observed for other strains such as FZB42 although smaller in amplitude but does not seem to apply to all members of this species since no stimulation was detected in the case of QST713 strain. Overall, *Bacillus* S499 is promising to be exploited as a biopesticide in a tropical environment, but the molecular basis of the phenomenon with respect to fungi perception and downstream signal transduction leading to an up-regulated CLP synthesis is still totally unknown. Further investigations are still needed.

DEDICACE

A Dieu Tout puissant créateur du ciel et de la terre. J'ai crié dans le désert, et tu m'as répondu dans le secret des tonnerres. Ce travail est le fruit de ta bénédiction.

*A mon épouse, **Fidélie Mushagalusa Mutalegwwa**. Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de durs labeurs, de compréhensions et de tolérances, de sacrifices, de privations et d'efforts communs en acceptant à un moment de ce travail de me soutenir non seulement moralement mais aussi financièrement*

*A mes filles **Gradie NKANA, Marina NSULI**, très contents que leur papa ait enfin fini les absences prolongées*

A mes parents et à ma belle famille, pour l'absence prolongée de leur fils et la peine endurée.

TABLE DES MATIERES

RESUME	i
SUMMARY.....	ii
DEDICACE.....	iv
Table des matières	v
Remerciements	x
Introduction générale	i
CHAPITRE 1. PROBLÉMATIQUES AGRICOLES ET LIÉES À L'USAGE DES PESTICIDES CHIMIQUES EN MILIEU TROPICAL.....	1
INTRODUCTION	1
1.1. LES PRINCIPALES MALADIES DU MAIS EN AFRIQUE ET DANS LA REGION DES GRANS LACS.....	4
1.2. LES MOYENS DE LUTTE COURAMMENT UTILISÉS EN AFRIQUE TROPICALE SUBSAHARIENNE.....	6
1.2.1. Les méthodes traditionnelles.....	6
1.2.2. La lutte agronomique, mécanique et physique.....	6
1.2.3. La lutte biologique.....	7
1.2.4. La lutte chimique	7
1.3. LA PROBLÉMATIQUE ET LE DIAGNOSTIC DE LA SITUATION ACTUELLE DE L'USAGE DES PESTICIDES EN AFRIQUE SUBSAHARIENNE (RD CONGO).....	8
1.3.1. La réglementation, la commercialisation et la distribution des pesticides en Afrique tropical subsaharienne.	9
CHAPITRE 2. OPPORTUNITÉS AUX BIOPESTICIDES MICROBIENS À BASE DE <i>BACILLUS SPP.</i> COMME MÉTHODE ALTERNATIVE EN AFRIQUE TROPICALE SUBSAHARIENNE 12	
2.1. MOTIVATION	12
2.1.1. Le marché et la production des bio pesticides microbiens à base de Bacillus spp et autres en Afrique tropicale subsaharienne	17
2.1.2. Politique, cadre réglementaire et enregistrement des biopesticides microbiens en Afrique tropical subsaharienne	23
2.2. DESCRIPTION DES MECANISMES D'ACTION DE <i>BACILLUS SPP</i> DANS LE BIOCONTROLE.....	24
2.2.1. Un antagonisme direct.....	24

2.2.2. Antagonisme indirect/Induction de résistance	29
2.3. AUTRES MECANISMES DES <i>BACILLUS SPP.</i>	31
2.3.1. Interférence avec le pouvoir pathogène	31
2.3.2. Modification des propriétés de surface de la feuille	31
2.4. EFFETS BENEFIQUES DES <i>BACILLUS</i> SUR LA CROISSANCE DES PLANTES ET L'AMELIORATION DU SOL	32
2.4.1. Colonisation des racines	32
2.4.2. Effets des Bacillus sur l'amélioration de l'agrégation et la stabilité structurale du sol ..	33
2.4.3. Solubilisation du phosphore.....	34
2.4.4. Fixation de l'azote	35
2.4.5. La phytostimulation	35
2.5. LES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES LIPOPEPTIDIQUES DE <i>BACILLUS</i> : STRUCTURES ET RÔLES DANS LA LUTTE BIOLOGIQUE	37
2.5.1. Importance des lipopeptides.....	37
2.5.2. Biosynthèse des lipopeptides par Bacillus	38
2.5.3. Structures et classification des lipopeptides de Bacillus spp	39
2.6. CONCLUSIONS	44
OBJECTIFS ET STRATEGIES	0
RESULTS	49
CHAPTER 3. CHARACTERIZATION OF FOUR ENDEMIC FUNGAL PATHOGENS ISOLATED FROM DISEASED MAIZE PLANTS	51
3.1. INTRODUCTION	51
3.2. MATERIALS AND METHOD.....	51
3.2.1 Fungal species identification and culture condition	51
3.2.2. Pathogenicity assays	52
3.3. RESULTS	52
3.3.1. Taxonomic identification based on morphological and genetic traits.....	52
3.3.2. Effect of pathogens on seeds and seedlings	54
3.4. CONCLUSIONS	55
CHAPITRE 4. LIPOPEPTIDES PLAY A MAJOR ROLE IN THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF <i>BACILLUS IN VITRO</i>	56
4.1. INTRODUCTION	56

4.2. MATERIALS AND METHODS	57
4.2.1. Bacterial strains culture conditions	57
4.2.2. First antagonism assays for in vitro screening of protective <i>Bacillus</i> strains.....	58
4.2.3. Lipopeptides extraction and analysis by UPLC-MS	59
4.2.4. In vitro evaluation of antifungal activity of semi-purified lipopeptides	59
4.2.5. Confrontation assays assays on natural maize root and seed exudates (MRE medium) .	60
4.2.6. Determination of lipopeptide production upon growth in root exudates and artificial media	61
4.2.7. Statistical analysis	61
4.3. RESULTS	62
4.3.1. Antagonistic activity of various bacilli in confrontation tests.....	62
4.3.2. Root colonization and in planta lipopeptide production on perlite-grown maize plantlets in comparison with artificiel media.....	64
4.3.3. Influence of temperature on the production of lipopeptides upon growth on maize exudates	66
4.3.4. Effect of temperature on the relative proportions of LP homologues	68
4.4.LIPOPEPTIDES PRODUCED BY <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS / SUBTILIS</i> PLAY A MAJOR ROLE IN THE INHIBITION OF PATHOGENS	71
4.4.1. Pathogen inhibition by <i>Bacillus</i> spp on maize exudates correlates with the differential accumulation of lipopeptides in the inhibition zone	71
4.4.2. Antifungal activity of semi-purified CLPs.....	75
4.4.3. Fengycins are the main lipopeptides formed by S499 restricting growth of <i>R. variabilis</i>	77
4.4.4. Conclusions	79
CHAPTER 5. STIMULATION OF FENGYCIN-TYPE ANTIFUNGAL LIPOPEPTIDES IN <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> IN THE PRESENCE OF THE MAIZE FUNGAL PATHOGEN <i>RHIZOMUCOR VARIABILIS</i>	81
5.1. INTRODUCTION	81
5.2. MATERIALS AND METHOD	82
5.2.1. Impact of <i>Rhizomucor variabilis</i> on lipopeptides production	82
5.2.2. RT-qPCR analysis of CLP gene expression.....	82
5.2.3. Assays to test the effect of volatile compounds	83
5.2.4. Statistical analysis	83
5.3. RESULTS	83

5.3.1. Fengycin synthesis by S499 is induced upon confrontation with <i>R. variabilis</i> on gelfified medium	84
5.3.2 The effect of fungal volatile compounds (VOCs) on CLPs production	87
5.3.3. Effect of coculture in liquid MRE medium on the production of fengycins and other lipopeptides.....	89
5.4. CONCLUSION	89
CHAPTER 6: REDUCTION OF FUNGAL INFECTION OF MAIZE SEEDLINGS BY <i>BACILLUS</i> IN GROWTH CHAMBER EXPERIMENTS	91
6.1. INTRODUCTION	91
6.2. MATERIALS AND METHODS	91
6.2.1. Biocontrol of pathogens by S499 on seeds and seedlings.....	91
6.2.2. Biocontrol on young plants in growth chambers	92
6.3. RESULTS	92
6.3.1. Biocontrol activity on seeds and seedlings	92
6.3.2. <i>Bacillus</i> S499 and QST713-mediated protection of seedlings and plantlets under lab conditions in growth chamber	96
6.4. CONCLUSION	98
CHAPTER 7. EFFICACY OF <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> AS BIOCONTROL AGENT TO FIGHT FUNGAL DISEASES OF MAIZE UNDER TROPICAL CLIMATES IN SOUTH KIVU	100
7.1. INTRODUCTION	100
7.2. MATERIALS AND METHODS	101
7.2.1. Characteristics of the two areas	101
7.2.2. Plant material and microbial inoculum preparation	102
7.2.3. Experimental design, infection, disease assessment.....	103
7.3. RESULTS	105
7.3.1. Biocontrol provided by S499 in field trials.....	105
7.4. CONCLUSIONS	114
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	115
CHAPITRE 8. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	115
8.1. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PATHOGENES	116
8.2. SELECTION <i>IN VITRO</i> DES <i>BACILLUS</i> POUR LEURS ACTIVITES ANTAGONISTE EN RELATION AVEC LA PRODUCTION DES LIPOPEPTIDES (CLPS).....	117

8.3. COLONISATION DES RACINES ET PRODUCTION DES FENGYCINES <i>IN PLANTA</i> PAR RAPPORT AUX MILIEUX ARTIFICIELS	120
8.4. LES FENGYCINES SONT LES PRINCIPAUX LIPOPEPTIDES ACTIFS DANS L'INTERACTION DE S499 AVEC <i>R. VARIABILIS IN PLANTA</i>	122
8.5. STIMULATION DES LIPOPEPTIDES ANTIFONGIQUES DU TYPE FENGYCINES CHEZ <i>BACILLUS S499</i> LORS DE LA PERCEPTION DE <i>RHIZOMUCOR VARIABILIS</i>	124
8.6. PROTECTION DES SEMIS ET DES PLANTULES DANS LES CONDITIONS DE LABORATOIRE EN PHYTOTRON	127
8.7. BIOCONTROLE DES PATHOGENES DANS LES CONDITIONS AGRONOMIQUES	128
8.8. EFFETS POSITIFS DE S499 SUR LA CROISSANCE DES PLANTES ET LE RENDEMENT EN GRAIN	130
8.9. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	132
Références bibliographiques	136

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche de cette thèse ont été réalisés à l'unité des bioindustries et au Centre Wallon de Biologie Industrielle, aujourd'hui Microbial Processes and Interaction. Qu'il me soit d'abord permis de tout cœur de remercier le Prof Honoraire Philipe Thonart pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir fait confiance en m'orientant sur ce sujet très passionnant. Il a toujours trouvé les mots justes et un soutien sans faille pendant les moments difficiles grâce à sa dimension humaine.

Je remercie plus particulièrement le Professeur Ongena Marc, promoteur de cette thèse, pour m'avoir accordé sa confiance et guidé avec une immense patience dans cette extraordinaire aventure. Vos conseils scientifiques avisés, votre savoir-faire, votre simplicité, votre perfectionnisme et votre rigueur scientifique m'ont considérablement aidé dans la réalisation de ce travail. Je suis également très honoré par le Prof Marie-Laure Fauconnier pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse malgré ses multiples responsabilités. Je remercie infiniment le Prof Philipe Jacques qui avait accepté de figurer dans le comité de cette thèse depuis l'Université de Lille avant de revenir à Gembloux.

Je remercie très sincèrement le Prof. Krier de l'université de Lille, en France pour avoir accepté d'être le rapporteur externe de cette thèse. Je tiens à adresser ma gratitude aux autres membres du jury pour leurs conseils, en particulier aux Professeurs Frank Delvigne, Magali Deleu et au Prof Georges Lognay qui ne cessait de venir vérifier s'il ne risquait pas de m'enfermer dans la salle de chromatographie après 17h00.

Merci particulièrement à Marina Chanet et Marguerite Demi pour tout et surtout pour votre sourire et votre assistance continue. Une de mes filles a accepté de porter ce nom de Marina.

Je remercie très sincèrement tout le personnel scientifique et technique du MIPI, en particulier ceux de l'équipe Lipopeptides, le Prof Patrick Fickers, Anthony, Aurélia, Hélène, Pascale, Cathy, etc. Je tiens aussi à adresser ma gratitude à Laurent Franzil pour l'initiation à l'identification et à la quantification des lipopeptides au UPLC-MS et pour votre amitié durant toutes ces années formidables passées ensemble. Je tiens à remercier solennellement le service Pain pour le Monde – Service protestant de développement en partenariat avec l'UEA ; Bukavu (Université Evangélique en Afrique) pour m'avoir soutenu financièrement par l'octroi d'une bourse d'étude.

Que les recteurs de l'UEA, Gustave Mushagalusa et le recteur honoraire Daniel Halldorf soient remerciés pour avoir milité auprès de Pain pour le Monde pour notre formation.

Je suis très reconnaissant envers les sacrifices de ma famille, pour m'avoir soutenu moralement et financièrement durant la période où on avait plus de bourse.

Je remercie aussi tout les soutiens obtenus du service pendant le moment difficile de la finalisation de cette thèse. Trouvez à travers cette phrase ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également à tous les doctorants et stagiaires avec lesquels j'ai passé des journées durant ces cinq années au CWBI, aujourd'hui MIPI de Gembloux pour leur amitié et sympathie.

En dehors de tout cadre professionnel, je voudrais remercier certaines personnes avec qui j'ai partagé des relations humaines fortes durant cette thèse. Merci à la famille Kahirika, Kazige, Bora, Jacques, Fabrice, Flory Koy (Zamunda), Lly Nyota, Pascal, Damas (l'homme), Parfait, à la famille Célestin Bamwisho, Aimé Heri Kazi Bisimwa, Dr Eugène Karenzi et à tous les amis de la région des grands-lacs d'Afrique centrale, particulièrement les garçons BK et tous les amis de l'AGE pour le réconfort lorsque le moral n'était pas au zénith, votre compagnie a fait de mon séjour en Belgique des moments de joies et de souvenirs heureux

Scientific communications

1. Zihalirwa Kulimushi Parent, Anthony Argüelles Arias, Laurent Franzil, Sébastien Steels, Marc Ongena (2017). Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* upon perception of the maize pathogen *Rhizomucor variabilis* ([Published in Frontiers in microbiology/Plant microb interaction section, IF:4.076](#)).
2. Zihalirwa Kulimushi Parent, Chuma Basime Géant, Mushagalusa Nachigera Gustave, Philippe Thonart1 and Marc Ongena (2017). Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu ([Published in Environmental and pollution research, IF:2.75](#)).
3. Zihalirwa Kulimushi Parent, Thonart Philippe and Ongena Marc (2017). Problématique de l'usage des pesticides chimiques et opportunités des biopesticides microbiens comme méthode alternative en milieu tropical: Cas de *Bacillus spp* (En préparation pour soumission)
4. Zihalirwa Kulimushi Parent, Thonart Philippe and Ongena Marc (2017). Screening of *Bacillus spp* strains for their ability to control maize pathogens in relation with lipopeptides production ([En préparation pour soumission](#)).
5. Zihalirwa Kulimushi Parent, Thonart Philippe and Ongena Marc (2017). Ability of *Bacillus amyloliquefasciens* S499 to control *Rhuzomucor Variabilis* endemic fungal pathogens of maize in field conditions of south Kivu, Eastern of democratic republic of Congo ([En préparation pour soumission](#)).

Présentations orales

Cameroon Forum for Biological Sciences (cafobios), Fourth Life Sciences Conference, quatrième journée des sciences de la vie (jsv2014), august 07-08, 2014 “Effects of temperature on the production of cyclic lipopeptides antibiotics by strains of *Bacillus* sp. and biological control fungal pathogens of maize”.

Posters

Bioforum 15/05/2014 (Liège, Belgium). Screening of *Bacillus* strains for their ability to control the pathogens of maize and the influence of temperature on their lipopeptide production.

Biomedica summit, 2014, 17&18 June, 2015 (Maastricht, The Netherlands) Screening of *Bacillus* strains for their ability to control the pathogens of maize and the influence of temperature on their lipopeptide production

10th International PGPR workshop, 16-19 June (Liège, Belgium) 2015. Evaluation of plant beneficial *Bacillus amyloliquefasciens* strains for the control of pathogens isolated from maize in south-Kivu, R. Congo.

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1. PROBLÉMATIQUES AGRICOLES ET LIÉES À L’USAGE DES PESTICIDES CHIMIQUES EN MILIEU TROPICAL

INTRODUCTION

Le maïs est la culture alimentaire de base la plus largement pratiquée en Afrique subsaharienne (ASS). Elle occupe plus de 33 millions d'hectares chaque année (FAOSTAT, 2015). La culture de maïs couvre presque 17 % des quelque 200 millions ha de terres cultivées en ASS. On estime que plus de 300 millions de personnes en ASS dépendent du maïs en tant que source d'alimentation et de subsistance. En République démocratique du Congo par exemple, le maïs est la principale céréale cultivée, suivie du riz et du sorgho, et la deuxième denrée alimentaire consommée par les Congolais après le manioc (Tollens, 2003). À Kinshasa par exemple, la consommation annuelle (Kg/tête) de maïs-grains est passée de 2,84 kg en 1975 à 6,68 kg en 2000, soit une augmentation de 235 %. La culture est pratiquée dans divers environnements de production et est consommée par des personnes ayant des préférences alimentaires et issues de contextes socio-économiques divers. Le maïs est consommé sous forme bouillie, cuite, grillée et sa farine sert à la fabrication de la pâte de maïs appelée « *Foufou* » qui est souvent consommée en mélange avec la farine de manioc. Il sert également à la fabrication du jus de maïs fermenté appelé « *Musululu* » et du whisky communément appelé « *Lutuku* ». En 2013, la production nationale de maïs était estimée à 1 156 410 tonnes, mais cette production ne suffit pas à couvrir les besoins du pays. Malgré son potentiel agronomique, le pays est obligé d'importer environ 35 377 tonnes supplémentaires de maïs pour couvrir les besoins nationaux (Service national des statistiques, 2012 : Banque centrale de la RD Congo, 2010). Ceci s'explique par les faibles rendements observés à l'hectare dus aux multiples contraintes que subit la culture. Les rendements sont variables d'une région à une autre, mais la moyenne nationale observée chez les petits agriculteurs reste faible et varie entre 0,8 et 1 t/ha, ce qui demeure très en deçà du rendement moyen du maïs (~5 t/ha) et est considérablement inférieur aux 4,4-5,4 t/ha observés d'après des essais de terrain des variétés améliorées avec des intrants optimaux et dans des conditions de gestion améliorées, menés à bien par le CIMMYT/IIAT en ASS. Les faibles rendements observés sont dus à une insuffisance d'azote dans le sol ; à un manque de disponibilité adéquate de semences améliorées ; aux intrants agricoles ; à des pratiques agricoles inadéquates ; et une incidence importante des maladies telles que le virus de

la mosaïque striée du maïs, la brûlure des feuilles causée par *Pythium*, la rouille, *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Gibberella*, *Helminthosporium maydi*, *Anthrachnose* et *Penicillium*. Mais il peut s'agir aussi d'autres champignons et insectes qui causent des dégâts sur les graines, les épis et les tiges, notamment *Fusarium spp*, *Rhospus stolonifer*, *Rhizomucor*, *Diplodia*, *Rhizoctonie* le flétrissement, les foreurs des tiges, la pyrale du maïs, etc. De même, le maïs est particulièrement sujet à la contamination par l'aflatoxine, ce qui entrave fortement l'amélioration de la santé des populations et l'augmentation des revenus. De même, on estime qu'une manipulation post-récolte inappropriée des céréales causerait 20 % de pertes évitables durant les étapes post-récolte. Partout en Afrique subsaharienne, les pertes pour toutes les cultures résultant des maladies et ravageurs au champ sont estimées à environ 30 à 40 % à l'est de la RD Congo et pourraient se généraliser sur l'ensemble du pays (Munyuli, 2001 ; Bagalwa et al., 1999). Pour réduire la pression de ces pertes sur les maïs, certaines méthodes (lutte chimique, biologique et intégrée) sont utilisées par les agriculteurs selon la taille et la vocation des exploitations, mais cela n'a pas empêché les pertes de production, ni les conséquences sur les utilisateurs, les consommateurs et l'environnement.

Depuis plusieurs décennies, la plupart des méthodes modernes de défense des cultures se sont basées sur l'emploi des produits phytosanitaires de synthèse chimique. La forte utilisation des pesticides était considérée comme un préalable à la réussite d'une stratégie de développement agricole rapide (Fleischer et al., 1998). L'utilisation des produits phytosanitaires chimiques a considérablement diminué la pénibilité du travail au champ tout en permettant une production suffisante et à moindre coût pour satisfaire tant le marché que les consommateurs (Jovana, 2013). Malheureusement, les pesticides font actuellement l'objet d'une préoccupation mondiale. En effet, le nombre de maladies et de décès liés aux pesticides ne cesse de croître. Actuellement, près de 750 000 personnes contractent, chaque année, une maladie chronique telle que les cancers, les malformations congénitales, l'asthme, le dysfonctionnement du système immunitaire, l'autisme, les perturbations neurologiques et les troubles de la reproduction suite à une exposition à des pesticides. Plus de 20 000 décès accidentels et 3 millions d'empoisonnements liés aux pesticides sont annuellement recensés (PAN Africa, 2003; Fleischer et al. 1998; OMS, 2004).

Bien que la part de l'Afrique dans la consommation mondiale de pesticides ne représente que 4 %, il n'en demeure pas moins qu'elle reste l'une des régions où les pesticides causent le plus de problèmes (FAO/OMS, 2001). Des cas d'intoxication liés aux pesticides et leur accumulation dans les aliments sont fréquemment rapportés en Afrique. C'est le cas par exemple à Kinshasa où le Ministère de santé publique et de l'environnement en 2006 avait observé un

cas où la vente de légumes récoltés par un maraîcher avant la fin de la période d'attente et leur consommation avait occasionné l'intoxication d'une famille. Une étude récente au Sud-Kivu a démontré une accumulation de Mancozébe commercialisé sous le nom de Ditham-45 et du dithiocarbamate dans les légumes, en particulier dans les tomates produites par les paysans maraîchers dans les grands centres de production du Sud-Kivu dans l'est de la RD Congo (Muyisa et al., 2014).

Dans ce contexte, le choix des méthodes alternatives comme la lutte biologique en utilisant les biopesticides microbiens serait une des solutions. Il s'agit d'utiliser des produits microbiens à base de *Bacillus spp.* pour augmenter la production du maïs (réduction de l'insécurité alimentaire) par l'intermédiaire d'une lutte efficace et éco-compatible contre les maladies causées par les pathogènes fongiques sur la culture d'une part et d'autre part, de la bio-fertilisation et de la bio-stimulation de la croissance des plantes. La protection des plantes par les bactéries du genre *Bacillus* est basée sur plusieurs modes d'action, parmi lesquels une forte activité inhibitrice de la croissance des pathogènes grâce à la production des composés antifongiques puissants dont les principales familles sont les surfactines, les iturines et les fengycines, ainsi que la capacité de stimuler l'immunité des plantes et d'augmenter leurs capacités défensives face à des infections ultérieures : « *phénomène d'ISR : Induced Systemic Resistance* » (Cawoy et al., 2014). Ce mécanisme revêt plusieurs bénéfices tels qu'une action sur différents types de végétaux, un faible risque d'apparition de résistance chez les pathogènes, une complémentarité avec d'autres stratégies de protection et une (éco) toxicité considérée comme négligeable. Ils peuvent être utilisés aussi bien en agriculture biologique qu'en agriculture conventionnelle. Ils sont biodégradables et ne laissent pas de résidus nocifs, ils peuvent être moins chers que les pesticides chimiques lorsqu'ils sont produits localement et peuvent s'avérer plus efficaces à long terme. Leurs avantages sont dus notamment à la suppression de tout délai entre le dernier traitement et la récolte (cfr. limite maximale de résidus), la possibilité de les utiliser sous une pression modérée à intense de la maladie et peuvent être les employés en mélange ou en rotation avec d'autres fongicides homologués. Bref, tout le contraire des inconvénients des pesticides chimiques. En outre, ces micro-organismes (les *Bacillus spp.*) peuvent produire les hormones de croissance, solubiliser les éléments minéraux du sol et les rendre biodisponibles pour la plante (Martinez-Viveros et al., 2010).

Dans cette synthèse bibliographique, nous relèverons les problèmes d'ordre réglementaire, technique, commercial et institutionnel liés à l'utilisation des pesticides en RD Congo, leurs conséquences sur les utilisateurs et sur l'environnement et nous proposerons à la fin la lutte

biologique à l'aide des *Bacillus spp.* comme alternative aux méthodes de lutte chimique en culture du maïs.

1.1. LES PRINCIPALES MALADIES DU MAIS EN AFRIQUE ET DANS LA REGION DES GRANDS LACS

Parmi ces maladies, on trouve celles d'importance commune qui attaquent toutes les plantes cultivées en stock comme au champ et celles uniquement spécifiques au maïs (Autrique & Perreau, 1983).

Les maladies d'importance commune. Elles s'attaquent à toutes les cultures. Les plus fréquemment rencontrées sur le maïs au champ comme en stock au Congo et partout dans la région des grands lacs d'Afrique centrale sont : *Aspergillus spp*, *Pythium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Diplodia*, *Rhizoctonia spp*, *Penicillium spp*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizomucor spp* et *Trichoderma*, *Cladosporium* ou *Alternaria*) *T. cucumeris*, *Pythium spp.*, etc. (Buyckx, 1962; Autrique & Perreaux, 1983). Ces champignons vivent et prospèrent tous dans le sol. Dans presque tous les cas, ces organismes peuvent infecter d'autres cultures que le maïs. À l'exception de *Pythium*, tous ces organismes peuvent vivre sur la semence de maïs ou à l'intérieur de celle-ci. Ils survivent très facilement sur ou dans le sol, ou sur les débris végétaux, et peuvent s'y maintenir pendant plusieurs années sous forme de spores, de zygosporès ou de mycélium. Outre l'altération des fruits, des légumes et des céréales, ces organismes provoquent aussi une pourriture des racines des arbres fruitiers, notamment les agrumes. Ils peuvent également s'attaquer aux graines en germination, entraînant ainsi une mauvaise levée des semis. Ces maladies se manifestent le plus souvent peu de temps après la levée. Les plantules flétrissent, jaunissent et meurent en s'affaissant parfois sur le sol. Les collets de ces plantes montrent différents types de symptômes : lésions déprimées brun-rouge qui s'étendent longitudinalement (*T. cucumeris*), lésions brun clair en anneau couvertes de mycélium blanchâtre (*C. rolfsii*), lésions aqueuses vert sombre (*Pythium spp.*), etc.

Le système racinaire présente souvent divers niveaux de dégradation. Ces micro-organismes sont présents dans la plupart des sols cultivés de la région des Grands Lacs et sont potentiellement nuisibles pour de nombreuses cultures (haricot, coton, pois, riz, maïs, etc.) (Autrique & Perreaux, 1983; Buyckx, 1962; Rostovic, 2000; Rupusudan et al., 2002).

Les maladies spécifiques. Parmi ces dernières, on trouve les maladies des taches brunes et de la brûlure des feuilles. Elles sont causées par *Drechslera turcica* (syn. *Helminthosporium*

turicum). *Rechslera maydis* (syn. *Helminthosporium maydis*), *Phyllosticta maydis* et les rouilles causées par *Puccinia polysora*, *P. sorghi*, *Puccinia polysora*, *P. sorghi*, *Phyllosticta maydis*. Ces maladies s'attaquent à la fois aux feuilles et aux tiges. Les principaux symptômes sont des taches sur les feuilles, le dépérissement du sommet du plant et la pourriture de la tige. Les taches sur les feuilles ont une couleur, une forme et une longueur variée selon les symptômes spécifiques de la maladie, mais elles ont souvent une teinte jaunâtre, un centre de couleur chamois et un contour brun rougeâtre (Autrique & Perreux, 1983; Buck, 1963; Rostovic, 2000). Des températures modérées (18 à 27° C) et une forte pluviosité favorisent le développement de la maladie. Les attaques précoces peuvent engendrer des chutes de rendement de l'ordre de 50 % (Autrique & Perreux, 1983; Buyckx, 1963). Le contrôle de ces maladies dans la région repose essentiellement sur l'utilisation de cultivars peu sensibles et résistants. La destruction des fanes après la récolte est aussi recommandée.

La pourriture des graines causées *Fusarium moniliforme/Pseudomonas fuscovaginae*, *Fusarium verticilloides*. Ces maladies causent des dégâts énormes au maïs partout dans la région des Grands Lacs d'Afrique centrale. Ces champignons s'attaquent aux racines de la plante, à la tige et provoquent la pourriture des épis. Toutes ces maladies rendent la production du maïs difficile et réduisent considérablement le rendement, surtout lorsque les feuilles sont attaquées. Les jeunes feuilles restent enroulées, jaunissent, puis brunissent et une pourriture humide atteint leur base. L'inflorescence mâle reste enfermée dans les feuilles engainantes, souvent courbées. Elle pourrit ou se développe mal. Plus bas sur la tige, les gaines foliaires sont marquées de taches brun rougeâtre, dont le centre finit par pâlir. Les plants infectés pendant leur jeune âge se développent mal et leur production est faible à nulle. C'est le cas du charbon, dont on estime qu'il peut causer une perte de rendement allant jusqu'à 10 %. Ces maladies peuvent se développer en stock, continuer leur cycle au champ et provoquer aussi l'accumulation des mycotoxines dans les graines (Autrique & Perreux, 1983).

La maladie des bandes causée par *Maize Streak Virus (MSV)*. Les symptômes n'apparaissent que sur les feuilles qui se forment après que la plante de maïs ait été contaminée par le virus. La densité des lésions est en relation étroite avec la sensibilité de la variété de maïs cultivée. Les plantes très sensibles infectées précocement sont atteintes de nanisme et ne produisent aucun épi. Les pertes de rendement peuvent aller jusqu'à 100 %.

1.2. LES MOYENS DE LUTTE COURAMMENT UTILISÉS EN AFRIQUE TROPICALE SUBSAHARIENNE

1.2.1. Les méthodes traditionnelles

L'agriculture africaine est dominée par l'agriculture traditionnelle de subsistance où les petits fermiers pratiquent des cultures mixtes et le germoplasme hétérogène des cultures (Youm et al., 1990). Beaucoup d'agriculteurs dans ce secteur sont pauvres et manquent de moyens pour acheter des produits commerciaux. Pour d'autres habitants des régions éloignées, l'accès aux pesticides est difficile. Pour se prémunir contre les maladies du maïs et d'autres cultures, les paysans utilisent des méthodes de routine qui consistent en la lutte agronomique, la lutte mécanique et physique, la lutte biologique et biotechnique, la lutte chimique et la lutte intégrée.

1.2.2. La lutte agronomique, mécanique et physique.

Elles regroupent toutes les techniques de lutte dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique, biochimique ou toxicologique. Il s'agit d'appliquer les méthodes culturelles permettant de contrôler les maladies (arrachage des plantes malades, association des cultures, utilisation des semences saines, variétés résistantes, etc.). Cependant, le recours à des ressources génétiques résistantes est la méthode la plus rentable et la moins nuisible pour l'environnement. La priorité a été accordée au développement des maïs hybrides et des maniocs résistants aux maladies depuis les années 1970 par l'IITA (Rostovic, 200) et aujourd'hui par Harvest-Plus /CGIAR/IITA qui vulgarisent des variétés maïs soi-disant résistantes aux maladies et biofortifiées en vitamines et en oligo-éléments essentiels.

(http://www.unscn.org/layout/modules/resources/files/HarvesPlus_Cassava_Strategy_FR.pdf, 07/06/2016). Une autre méthode utilisées depuis longtemps par les paysans est **la méthode biotechnique** considérée comme un cas de lutte biologique et qui consiste à utiliser les produits (extraits) issus des différents organes des plantes, ayant des propriétés insecticides, bactéricides, fongicides, virucides, nématoïdes et répulsifs, pour faire face aux nuisibles (cendre, poudre, jus des feuilles, racines et fruits) au champ ou en stock pour la conservation des récoltes (Munyuli & Balezi, 2001; Munyuli, 2002; Balagizi et al., 2005 , Gabriele, 2002.). Les autres méthodes traditionnelles sont souvent appliquées pour la conservation des denrées stockées consistent à **l'exposition des denrées**, en couches minces, au rayonnement solaire intense, **L'utilisation des matières inertes** : dans des récipients de stockage en vrac (jarres, fûts, greniers). On

mélange parfois de la cendre ou du sable fin aux graines de maïs, selon des proportions et des pratiques qui varient suivant les régions. Ces matériaux pulvérulents remplissent les vides entre les grains et constituent une barrière à la progression des femelles cherchant à pondre. Ces matériaux fins auraient également un rôle abrasif sur les insectes et entraîneraient leur déshydratation (Cruz et al, 1998). **La conservation en atmosphère confinée**, elle consiste à appauvrir l'atmosphère inter-granulaire en oxygène jusqu'à un taux létal pour les insectes. **L'enfumage** consiste à stocker les grains en épis au-dessus des foyers domestiques. L'enfumage permanent du lot (parfois appelé à tort fumigation) ne tue pas les insectes, mais les éloignent, et empêche la réinfestation.

1.2.3. La lutte biologique

En Afrique, le contrôle biologique à base des microorganismes était utilisé depuis longtemps dans l'ignorance. Des produits à base de champignons de *M. Anisopliae* efficaces contre les ravageurs étaient déjà utilisés sans être documentés (Lomer & Prior, 1992 ; Bateman, 1997; Hunter et al., 2001, Mishra et al., 2015). Des études sur l'utilisation des virus contre les insectes nuisibles sont également signalées, mais leur utilisation commerciale n'a pas aussi été bien documentée en dépit d'un large besoin pour leur utilisation suite aux contraintes financières et techniques (Cherry, 2004). Les méthodes de lutte qui ont dominé le continent ont concerné surtout la lutte contre les insectes par des lâchers des divers prédateurs et parasitoïdes comme par exemple dans la lutte contre la cochenille farineuse du manioc (Tata-Hngi K, 1995) et l'utilisation de microorganismes en lutte biologique la plus documenté et la plus importante dans le temps a été accordée à *Bacillus thuringiensis* contre les insectes ravageurs du coton, le maïs et ensuite en culture maraîchère (cfr google scholar) .

1.2.4. La lutte chimique

L'utilisation des pesticides chimiques pour combattre les ennemis des plantes existe depuis longtemps en Afrique tropical subsaharienne comme partout dans la région des grands lacs, mais généralement, elle était réservée aux plantations industrielles et aux sociétés multinationales. Elle était aussi pratiquée en culture maraîchère par les petits agriculteurs, et pour la culture des pommes de terre dans le Nord et le Sud-Kivu en RD Congo afin de lutter contre le mildiou et d'autres maladies cryptogamiques (Frans, 2011 ; IDRC, 1999). Mais la

demande en légumes et les prix élevés de ces denrées dans les villes (jusqu'à quatre dollars le kilo) ont incité de nombreux chercheurs d'emploi à se lancer dans une agriculture urbaine à petite échelle qui utilise de plus en plus les pesticides de synthèse chimique d'une façon empirique. L'installation de plusieurs firmes agro-industrielles, le développement de l'agriculture urbaine et périurbaine et la vulgarisation de l'intensification agricole à travers la gestion intégrée de la fertilité des sols (GIFS) par des organisations internationales de développement comme l'IFDC pour son projet CATALIST dans la région des Grands Lacs en culture céréalière comme le maïs et le riz irrigué destinés à la vente, ont stimulé les paysans à utiliser les pesticides, les herbicides et les engrains chimiques.

1.3. LA PROBLÉMATIQUE ET LE DIAGNOSTIC DE LA SITUATION ACTUELLE DE L'USAGE DES PESTICIDES EN AFRIQUE SUBSAHARIENNE (RD CONGO)

Les problèmes rencontrés dans la gestion des pesticides sont en général liés au type et aux objectifs de l'exploitation.

Au niveau de l'exploitation traditionnelle familiale, par exemple en RD Congo, les paysans qui pratiquent l'agriculture de subsistance pour la survie de leurs ménages n'utilisent généralement pas de pesticides, sauf pour les cultures destinées à la vente. Cependant, les produits antiparasitaires utilisés par les petits producteurs sont appliqués de façon empirique et cela en dehors de toute norme sécuritaire et environnementale. En effet, les agriculteurs (les maraîchers) achètent des pesticides en quantité très réduite, reconditionnés parfois dans des flacons de 100 ml sans étiquette, sans connaître les ravageurs spécifiques à combattre, ni la concentration et la formulation du produit, ni la dose à utiliser, avec des matériels de traitement défectueux et sans équipements de protection pendant le traitement par manque de moyens. Le délai de sécurité de 2-3 semaines avant la récolte des légumes traités n'est jamais respectée (Ministère de l'agriculture, pêche et élevage, 2016; Kaseko, 2010). Les pesticides se retrouvent de façon innocente dans les assiettes des consommateurs. Une étude récente menée au Sud-Kivu a analysé les résidus présents dans les légumes produits dans le principal centre de production des cultures maraîchères du Sud-Kivu (Kamanyola, Kavumu, Ktana, Mudaka, Nyangezi et Kabare). Les résultats obtenus ont montré que le Mancozèbe commercialisé sous le nom de Ditham-45 et le dithiocarbamate ont été largement retrouvés dans les légumes, en

particulier dans les tomates (Muyisa et al., 2014). Parmi les échantillons de tomates, 24 % avaient des valeurs de résidus en mancozèbe au-dessus des limites minimales de résidus (LMR) de l'Autorité européenne de sécurité alimentaire et 33 % au-dessus des LMR fixées par l'EPA, tandis que 73 % des tomates n'étaient pas bonnes à la consommation en ce qui concerne le niveau maximal autorisé pour les dithiocarbamates dans les tomates (1 mg/kg) si on se réfère aux normes exigées en Allemagne (Muyisa et al., 2014). En outre, il faut signaler plusieurs cas d'utilisation abusive des pesticides et d'intoxication involontaire qui ont été dénoncés par la population rurale. La population se badigeonne directement avec des pesticides pour lutter contre ces ravageurs, capture des gibiers par appât empoisonné aux pesticides et des poissons par contamination des rivières. Ces aliments contaminés finissent également dans l'assiette des consommateurs. Les pesticides étant parfois fournis dans des emballages non conformes et sans étiquette, la population confond de temps en temps les pesticides et les ingrédients de cuisine. Les pesticides sont stockés dans les mêmes entrepôts que la récolte et les autres biens de la ferme ; la manipulation et le transport des pesticides ainsi que des récoltes traitées sont effectués par des personnes non informées sans précaution sécuritaire appropriée, etc.

Au niveau de l'exploitation industrielle, les travailleurs traitent des grandes superficies sans équipement complet de protection. Les informations sécuritaires appropriées avant, pendant et après les traitements ne sont pas données aux travailleurs. Les pesticides sont aussi stockés dans les mêmes entrepôts que les autres biens de la société, sans disposition sécuritaire recommandée en la matière. Une étude menée dans les exploitations industrielles du coton dans l'est de la RD Congo a révélé plusieurs cas d'intoxications aigües suite aux manipulations des pesticides et d'engrais (Panda-Lukongo, 2014). Compte tenu de l'absence d'un système adéquat et opérant d'enregistrement des cas, nous n'avons pas la possibilité d'en estimer la prévalence. Ceci rejoint le constat de plusieurs études faites dans les pays en développement (OMS, 2000; Ngowi et al., 2002).

1.3.1. La réglementation, la commercialisation et la distribution des pesticides en Afrique tropical subsaharienne.

Dans les pays d'Afrique tropical subsaharienne, la gestion des produits phytosanitaires est encadrée par des lois. Ces pays ont aussi signé plusieurs accords, des conventions et traités internationaux parmi lesquels certains ont une action directe sur les pesticides et la pollution, notamment la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (POPS) et la

Convention de Rotterdam selon laquelle les produits chimiques ou pesticides dangereux inscrits à l'annexe III de cette convention font l'objet d'un consentement préalable à l'importation entre parties. Chaque partie exige que, sans préjudice des conditions exigées par la partie importatrice, les produits chimiques inscrits à l'annexe III et les produits chimiques interdits ou strictement réglementés sur son territoire soient soumis, lorsqu'ils sont exportés, à des règles d'étiquetage propres à assurer la diffusion des renseignements requis concernant les risques et les dangers pour la santé des personnes ou pour l'environnement, compte tenu des normes internationales applicables en la matière (article 13, paragraphe 2, texte de la Convention, édition révisée en 2011). Sur le terrain, l'application de cette loi n'est pas encore de mise. Il n'est pas surprenant, comme par exemple en RD Congo et dans beaucoup de pays d'Afrique subsaharienne, d'observer que les pesticides soient commercialisés dans les maisons d'habitation, dans les marchés publics où ils sont étalés à proximité des denrées consommables, les boutiques, etc. Des problèmes se posent très souvent avec les produits qui entrent frauduleusement dans le pays, dont certains d'entre eux ont déjà été retirés du marché à cause de leur toxicité ou de leur péremption et d'autres arrivent dans des récipients déformés, non appropriés et non étiquetés. Ces produits de mauvaise qualité contiennent fréquemment des substances dangereuses et des impuretés qui ont déjà été interdites ou ont fait l'objet de restrictions sévères ailleurs et qui contribuent souvent à l'accumulation des stocks de pesticides périmés dans les pays en développement (FAO, 2011).

Le public utilisateur de ces produits n'est pas informé des risques qu'il court en manipulant ces produits, ce qui est souvent la cause d'accidents professionnels, d'intoxications ou d'empoisonnements alimentaires. Bien qu'il existe des problèmes au niveau de la distribution et de la commercialisation des pesticides, on observe toutefois que certains importateurs respectent les normes.

La plupart des pays d'Afrique subsaharienne dont la RD Congo n'ont pas de réglementation spécifique ni de politique en matière de stockage, de gestion des emballages vides et de destruction des pesticides périmés et obsolètes. La gestion des emballages est de la responsabilité des utilisateurs ; la gestion des emballages reste encore un défi à relever dans la commercialisation des pesticides, car les utilisateurs ne sont pas suffisamment sensibilisés aux techniques de gestion des emballages vides. Une réglementation doit être appliquée auprès des distributeurs importateurs quant à la récupération des flacons vides pour destruction ou incinération contrôlée conformément aux recommandations récentes de la FAO. Malheureusement, les contenants et récipients vides ayant renfermé des pesticides sont réutilisés pour les besoins ménagers (stockage, conservation et transport des aliments).

CHAPITRE 2. OPPORTUNITÉS AUX BIOPESTICIDES MICROBIENS À BASE DE *BACILLUS SPP.* COMME MÉTHODE ALTERNATIVE EN AFRIQUE TROPICALE SUBSAHARIENNE

2.1. MOTIVATION

En Afrique en général comme dans la région des grands lacs d'Afrique centrale, il existe un intérêt général pour l'utilisation des agents de lutte microbien comme alternative ou adjuvant aux pesticides chimiques synthétiques pour une gamme d'applications agricoles et horticoles. En effet les agents de lutte microbiens (MBCA) sont perçus comme une technologie socialement souhaitable mais qui semble néanmoins limitée par un certain nombre de facteurs empêchant une adoption plus large qui seront présentés plus tard.

La dépendance vis-à-vis des intrants non durables (engrais et de pesticides) engendre des conséquences que nous avons présenté précédemment. Par conséquent, l'utilisation de plantes/cultures transgéniques et de microorganismes favorisant la croissance des plantes dans le but d'accroître la productivité est actuellement attrayante en Afrique. Ceci a été motivé pour la première fois par l'industrie horticole du Kenya qui est la deuxième plus importante source de devises étrangères après le thé. Elle rapporte 300 000 000 \$ US par an. Elle crée des emplois tant pour les populations rurales que pour les populations urbaines estimées à 500 000 et à plus de 2 millions de personnes respectivement (Mehrdad, 2004). Le Kenya et l'Afrique du Sud sont les plus grands exportateurs de fleurs, fruits et autres produits horticoles vers l'union européenne, avec 25% de la part du marché, où 50 000 tonnes de fleurs sont exportées chaque année par le Kenya. L'industrie horticole est le principal secteur consommateur des pesticides alors que les clients du marché d'exportation exigent maintenant une réduction de l'utilisation des pesticides. Des limites minimales de résidus (LMR) ont été adoptées par l'union européenne qui ne tolère aucune trace des résidus détectables. Il existe également une réglementation phytosanitaire stricte qui ne tolère pas les ravages ou les dommages causés à la production. C'est donc un défi pour le Kenya, l'Afrique du Sud et d'autres pays africains de produire des produits sans dommage et exempts de pesticides (Cherry & Gwynn, 2007). La seule façon de sortir de ce problème est d'adopter des méthodes naturelles

de lutte antiparasitaire. Pour relever ces défis et pour répondre aux exigences de l'union européenne, plusieurs producteurs de produits horticoles et d'autres cultures d'exportation se sont lancés dans la production d'agents de lutte de biologique à base de *Bacillus* et d'autres microorganismes comme biopesticides et il existe aujourd'hui plusieurs firmes qui se sont installées en Afrique (Kenya, Afrique du Sud, Ghana) en vue de satisfaire la demande locale. En plus, dans la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne comme la région des grands lacs d'Afrique centrale, le traitement des semences de maïs et d'autres cultures est un facteur de sélectivité. Mais le traitement des semences par les pesticides protège la culture au premier stade et est généralement coûteux. Dans les pays en développement, les graines non semées sont fréquemment utilisées pour l'alimentation humaine (Dale, 1980). Il est donc généralement déconseillé de traiter les semences avec des pesticides chimiques dans ce pays, car cela présenterait des risques pour la santé humaine (Dale, 1980). Il est donc clair qu'afin de lutter contre les maladies, on pourrait appliquer des organismes microbiens au lieu de traiter les semences avec des produits chimiques. Sur le marché intérieur également à cause de l'urbanisation galopante on observe de plus en plus des supermarchés qui font une sensibilisation croissante auprès des détaillants des fruits et légumes frais sur les bonnes pratiques agricoles y compris la lutte intégrée pour disponibiliser aux consommateurs les produits de bonne qualité. Le premier biopesticide microbien utilisé en Afrique fut *Bacillus thuringiensis* contre les ravageurs des plantes, particulièrement le maïs (Wabule et al., 2004, Jürgen Langewald et al., 2000). Cette bactérie est essentiellement utilisée pour la lutte contre les insectes ravageurs et est à l'origine du gène utilisé dans les «cultures Bt GMO» résistantes aux insectes. D'autres isolats de plusieurs genres bactériens ont été utilisés avec succès pour la protection des cultures et de nombreux produits énumérés dans le tableau 1 sont actuellement commercialisés dans le milieu tropical subsaharien pour le contrôle des maladies des plantes.

Dans les pays où les bio pesticides microbiens sont de plus en plus adoptées comme l'Afrique du Sud, le Kenya et la Tanzanie qui a mis récemment un programme de lutte biologique suite aux exigences du marché Européen, plusieurs souches de *Bacillus* et d'autres microorganismes sont utilisées avec succès pour lutter contre les pathogènes des plantes en serre, aux champs et des fruits destinés à la commercialisation en post récolte. Par exemple, les systèmes de contrôle biologique des agrumes et des cultures fruitières subtropicales ont été étudiés à l'université de Pretoria pendant plus de 20 ans (Korsten, 2003, Korsten et al. 1997, Burger & Korsten 1988). Diverses souches de *Bacillus spp.* ont été utilisées avec succès pour le contrôle de plusieurs maladies responsables de la pourriture des fruits d'avocat et de la mangue, particulièrement

l'anthracnose, la cercosporiose, la pourriture brune ainsi que les infections secondaires sur le litchi et les agrumes. Le contrôle a été réalisé grâce à des pulvérisations sur les produits destinés à la commercialisation en pré-récolte, par trempage ou soit des pulvérisations post-récolte (Korsten, 2003). Les traitements dans le cadre de la lutte intégrée impliquant des antagonistes combinés avec des doses de fongicides, de désinfectants ou d'extraits végétaux naturels ont également été testés en vue de démontrer l'avantage de différentes souches de *Bacillus* par rapport aux pesticides chimiques et les autres biopesticides. L'attachement d'antagonistes, la colonisation et leur survie sur les organes des fruits et tiges ont été étudiés en utilisant plusieurs techniques, y compris les comptages des cellules viables, la microscopie électronique et des anticorps monoclonaux (Towsen, 1996, Korsten, 2003). Les modes d'action de ces différentes combinaisons antagoniste-pathogène-hôte ont indiqué plusieurs niveaux d'interactions qui dépendaient du temps et de la densité d'application des agents de lutte biologiques et comprenaient les métabolites secondaires, des composés volatils, la compétition pour les nutriments et la colonisation compétitive de la surface des organes à traiter. Des techniques innovatrices de dissémination d'antagonistes à base de *B. subtilis* (Avogreen) sur les fleurs en utilisant les abeilles pollinisatrices dans des vergers commerciaux, l'utilisation des bouchons en plastique à base de laine pour fournir un effet de libération lente de l'agent antagoniste dans les conditions de champ ont été développées. A partir de ces résultats, les industries fruitières d'Afrique du Sud et l'Université de Pretoria détiennent actuellement le brevet en ce qui concerne la formulation, l'application et la commercialisation de cette souche. Dans d'autres études, *Bacillus subtilis* ATCC55466/ B246 a été utilisé avec succès pour protéger les fruits d'avocat destinés à la commercialisation contre *Colletotrichum gloeosporioides* sur les fruits et les tiges en Afrique du Sud (Korsten *et al.*, 1993), *Bacillus* (isolatEBS8), *Citrobacter* ADS14, *Enterobacter* IGBR11 et *Lysinibacillus* EPR2 contre *Fusarium verticilloides* sur les semences et *B. subtilis* contre *Aspergillus*, *P. italicum*, *R. solani*, de l'épis de maïs au Nigeria (Abiala *et al.*, 2015, Ekundayo, 2011), *Bacillus subtilis* 101,102 et 204 sur les maladies des feuilles et des racines sur plusieurs cultures au Kenya (Todd Kabaluk *et al.*, 2010). Dans des essais à grande échelle menés pendant 3 années consécutives en Afrique du Sud dans des vergers commerciaux d'avocatier, Korsten, *et al.*, 1997 ont démontré qu'une pulvérisation en masse de *B. subtilis* B246 à une dose de 10^7 cellules.ml⁻¹ par arbre avait réduit significativement les symptômes de *Pseudocercospora purpurea* et *Akaropeltopsis sp.* Et une amélioration de la qualité des fruits avait été également observée. En comparant ce traitement avec les pesticides de synthèse chimique comme l'oxychlorure de cuivre ou le benomyl, les résultats ont été les mêmes. Par contre la poursuite de ceux deux traitements au fur des années, ils trouvent que l'efficacité de

traitement chimique à base l'oxychlorure de cuivre diminuait par rapport à celle de *B. subtilis* B246. Dans la plaine de la Ruzizi au Burundi, Nihorimbere et al., 2010 ont démontré la capacité de *B. amyloliquefasciens* S499 de contrôler différentes espèces de *Fusarium* sur la tomate en champ et un effet bénéfique sur la croissance des plantes et augmentant le rendement à l'hectare a été observée. Récemment nous avons démontré la capacité de *B. amyloliquefasciens* S499 de contrôler les pathogènes (*R. stolonifer*, *F. verticilloides*, *P. ariabile*) et d'augmenter le rendement en épis du maïs en relation avec la solubilisation du phosphore et la production des hormones de croissance en champs en climat tropical d'altitude et tropical sec en RD Congo. Le tableau 2.1 présente quelques exemples d'application de *Bacillus* comme agent de lutte biologique sur les maladies des plantes et des denrées stockées par pays en Afrique subsaharienne.

Tableau 2.1. Certaines souches de *Bacillus* qui ont été testées sur diverses cultures par pays en Afrique tropicale subsaharienne

Souches	Plantes	Maladies	Conditions	Pays	Auteurs
<i>B. subtilis</i> B9, B11, B69, B77 et B81	Maïs, Cocombre, Lettue	<i>F. verticilloides</i> , <i>F. equiseti</i> , and <i>R. solani</i>	Controlées	KwaZulu-Natal, South Africa	Killani et al.,2011
<i>Bacillus subtilis</i>	Niébe	<i>Dothiorella aromatica</i> , <i>Phomopsis perseae</i>	Controlée	KwaZulu-Natal, South Africa	Killani et al.,2011
<i>B. subtilis</i> B246	Tiges, Fruit et fleurs d'avocat	<i>Botryodiploidia theobromae</i> Pat, <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium sclerotigenum</i> Yamamoto, <i>Botryodiploidia theobromae</i> Pat, <i>Fusarium moniliforme</i> Wollen and Reink., <i>Penicillium sclerotigenum</i> Yamamoto, and <i>Rhizoctonia sp.</i> "	Post récolte	Abia State, Nigeria	Ralph and Okigbo,2002
<i>B. subtilis</i> EnrenbergCohn	Tubercules d'ignames	<i>Botryodiploidia theobromae</i> Pat, <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium sclerotigenum</i> Yamamoto, <i>Botryodiploidia theobromae</i> Pat, <i>Fusarium moniliforme</i> Wollen and Reink., <i>Penicillium sclerotigenum</i> Yamamoto,	Post récolte	Abia State, Nigeria	Okigbo,2004

		<i>and Rhizoctonia sp."</i>			
<i>B. subtilis B1, B. subtilis B2 Bacillus isolate K194+USDA2674 and K194 + CIAT 899</i>	Tubercules d'ignames	<i>Penicillium oxalicum, Botryodiploidia theobromae, Aspergillus niger, Penicillium oxalicum and Rhizoctonia spp. Aspergillus niger, P. oxalicum and Fusarium solani</i>	<i>Post récolte</i>	<i>Abia State, Nigeria</i>	Okigbo,2004
<i>Bacillus isolates viz.,K158, CB4, K194, K67, K89, and K86</i>	Haricot	<i>root-knot nematodes</i>	<i>Champ et condition contrôlées</i>	<i>Nigeria</i>	Karanja et al.,2007
<i>Bacillus subtilis-BS21,</i>	Niébé	<i>Aspergillus flavus, A. ochraceus, Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>Conditions contrôlées</i>	<i>Ogun State, Nigeria</i>	Adebanjo and Bankole,2003
<i>Bacillus penetrans</i>	haricot	<i>M. incognita pop. 1 M. incognita pop. 2 M. incognita pop. 3 M. incognita pop. 4 M. javanica pop. 1 M. javanica pop. 2 M. javanica pop. 3 Meloidogyne sp. G Meloidogyne sp. SC</i>	<i>Conditions contrôlées et Champs</i>	<i>Afrique du sud</i>	Vaughan Spaul et al.,1982
<i>Bacillus cereus.</i>	Sorgho	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Conditions contrôlées et champs</i>	<i>Ethiopie et Afrique du sud</i>	Ahmed Idris et al., 2007
<i>Bacillus licheniformis</i>	Fruit de mangue	<i>Anthrachnose et cercosporiose des fruits</i>	<i>Post récolte</i>	<i>Prétoria Afrique du Sud</i>	Silimela M et al., 2006
<i>B. subtilis(B246) OMega</i>	Tiges, feuilles et fruits	<i>C. gloeosporioides, Dothiorella aromatica, Thironectria pseudotrichia, Phomopsis perseae, Pestalotiopsis versicolor, and Fusarium solani, B. cinerea,</i>	<i>en plantation commerciale</i>	<i>Afrique du Sud</i>	Korsten, L. et al.,1997
<i>B. amyloliquefaciens PPCB004</i>	Fruit de Pêcher	<i>P. expansum et R. stolonifer</i>	<i>Post-récolte</i>	<i>Afrique du Sud</i>	Eva Arrebola et al.,2009
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pourriture des tiges et fruits de mangue	<i>C. gloeosporioides, B. theobromae, Botryosphaeria spp</i>	<i>Post récolte et en champs</i>	<i>Sout Africa Sout Africa</i>	Veloshinie Govender et al.,2005

<i>Bacillus subtilis</i> B246	Avocat	<i>Dothiorella aromatica</i> and <i>Phomopsis perseae</i>	Post récolte	Sout Africa	Besrat Tesfagiorgis et al., 2005
<i>Bacillus subtilis</i> BS21, BS22, BS23	Niébé	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. flavus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>Penicillium aurantiogriseum</i> <i>Trichoderma viride</i> TH14	<i>Semence et plantes en champs</i>	Ogun State, Nigeria	Adebanjo and Bankole , 2004
<i>B.amyloliquefasciens</i> <td>Tomate</td> <td><i>F. semitectum</i></td> <td><i>En champ</i></td> <td>Burundi</td> <td>Nihorimbere et al., 2010</td>	Tomate	<i>F. semitectum</i>	<i>En champ</i>	Burundi	Nihorimbere et al., 2010

Bien que l'utilisation des biopesticides microbiens est en croissance au Kenya et en Afrique du Sud suite aux exigences du marché européen, dans d'autres pays comme le Rwanda, le Burundi et la RD Congo, les quelques utilisations de *Bacillus* se sont limitées seulement à quelques expériences de recherche. Actuellement le *Rhizobium* est le seul microorganisme exploité en agriculture comme biofertilisant pour pallier à la carence en azote dans le sol grâce au programme N2 Africa initié par le CIAT, l'IITA, le TSBF. (Woomer, et al., 2014). D'après les potentiels que possèdent les *Bacillus spp.* par rapport aux *Rhizobium*, ils pourraient potentiellement être aussi exploités dans les pays de la région des grands lacs comme c'est le cas déjà dans d'autres pays tropicaux d'Afrique centrale et australe pour améliorer le rendement des cultures et contribuer à la sécurité alimentaire. En effet, certaines souches de *Bacillus* en tant que rhizobactéries ont la capacité de contrôler les pathogènes des plantes grâce à divers mécanismes, coloniser les racines et de fixer l'azote comme les rhizobiums (Ding et al. 2005).

2.1.1. Le marché et la production des biopesticides microbiens à base de *Bacillus spp* et autres en Afrique tropicale subsaharienne

La majorité des biopesticides commercialisés est d'origine microbienne. Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74 % du marché mondial, dont les insecticides à base de *B. thuringiensis* y sont les plus représentés (Rosas-Garcia, 2009). En Afrique, en dépit d'un large intérêt pour l'utilisation des agents de lutte biologique, leur disponibilité pour les utilisateurs est encore limitée suite à une forte demande, les contraintes techniques, financières et réglementaires (Cherry and Gwynn, 2007, Jitendra Mishra et al., 2015). Selon les estimations, les ventes annuelles des biopesticides pour l'ensemble de l'Afrique en 2003 étaient d'environ 23 millions de dollars, dont 5 millions pour les produits bactériens (Guillon 2003). Au Kenya, par exemple, en 2002, les ventes totales de pesticides ont été estimées à environ 57,4 millions de dollars, dont 1,15 million de dollars (2%) sont attribuables

aux ventes des agents de lutte biologique, principalement des produits à base de *B. thuringiensis* (Wabule et al., 2004). Avec l'augmentation de l'exportation des produits horticoles, fruitiers et stimulants comme le café et le thé vers l'Europe, on estimait déjà depuis 2010 que le marché de biopesticides pourrait atteindre en 2015 une somme de 150 millions de dollars en Afrique subsaharienne.

(https://marketpublishers.com/report/industry/agriculture/2010_biopesticides_market_in_latin_america_africa_n_middle_east.html). Dans l'ensemble du continent les données concernant l'utilisation de *Bacillus* et autres microorganismes comme biopesticides ne sont pas bien documentées (Jitendra Mishra et al., 2015). Cependant, les agents de lutte biologique commercialisés en Afrique sont constitués essentiellement des micro-organismes (bactéries, champignons, virus, etc.), de plantes (Neem, Pyrèthre, etc.) et d'ennemis naturels des parasites (parasitoïdes, prédateurs et pathogènes). Sont également inclus dans les biopesticides des produits sémio-chimiques (par exemple des phéromones sexuels d'insectes), des enzymes (protéines) et des régulateurs naturels de croissance des plantes et d'insectes.

Des produits d'agents de lutte biologique à base de *Bacillus spp* tels que Kodiak (*Bacillus subtilis*), Serenade (Wettable powder) avec *B. subtilis* strain QST 713, Companion–Liquid (*B. subtilis*, Strain GB03), Bioplus-2B-pellet (*B. licheniformis* DSM 5719, Shelter (*B. subtilis* 101), Artemis (*B. subtilis* 102) et d'autres microorganismes comme Bio-save (freeze-dried pellet) à base de *P. syringae* van Hall ESC-10 ; BioCoat (*P. fluorescens* WCS374), Bio-Power 1.15 WP (*Beauveria bassiana* Strain GNA), Xpo™ Liquid, *Xanthomonas campestris* etc., sont enregistrés et commercialisés sous diverses formulations en Afrique, principalement au Kenya et en Afrique du Sud qui sont considérés comme pays de référence en milieu tropical subsaharien (Olubukola,2012). Le Tableau 2.2. présente par pays les biopesticides microbiens à base de *Bacillus* et d'autres microorganismes commercialisés en Afrique tropicale, leur usage ainsi que les sociétés productrices.

Les fournisseurs des biopesticides sont principalement des petites et moyennes entreprises qui ont des difficultés compréhensibles à développer de nouveaux produits et à commercialiser pleinement ceux déjà existants (Farm Chemical International, 2010). Il apparaît donc que partout dans le monde, les agents de lutte biologiques sont vendus en faibles volumes par rapport aux pesticides chimiques et ceci est aggravé en Afrique en raison de la nature fragmentée de ses marchés ; du grand nombre des pays, de la diversité des cultures cultivées, de la répartition éparse des fermes et de la faible valeur des cultures (Cherry & Gwynn ,2007). Dans les cas où la demande des BCA (Biological control agents) est apparue en Afrique, par exemple pour fournir aux exportateurs de produits frais en Afrique du Sud et au Kenya, la

capacité de production des agents de lutte biologique a été établie. Au Kenya, Dudutech (Kenya) Ltd. et Real IPM se sont installés au niveau local pour consolider et soutenir l'industrie d'exportation des fleurs, fruits et des légumes afin de fournir des produits compatibles avec la lutte antiparasitaire et conformes aux réglementations de l'UE. En Afrique du Sud, BCP Ltd. et d'autres sociétés s'y sont installées en réponse à la demande des exportateurs et ont rencontré un succès parce que les marchés y sont plus grands et plus homogènes (Cherry & Gwynn, 2007). Cependant, la demande de certaines BCA pour utilisation dans des cultures d'exportation spécifiques est supérieure à l'offre. Les exportateurs s'attaquent à ce déficit en s'engageant avec les producteurs de BCA au sein et en dehors de l'Afrique pour l'approvisionnement direct en produits issus des BCA et le transfert des technologies de production vers l'Afrique (Cherry & Gwynn, 2007). Toujours pour chercher à satisfaire les besoins de l'industrie horticole, fruitière et autres, récemment une société belge « **Biopest** » a mis ses efforts en commun avec la société britannique « **Real IPM-Kenya** » spécialisée dans la production des biofungicides et des biofertilisants à base de *Bacillus subtilis* et d'autres microorganismes bénéfiques pour la croissance et le contrôle des pathogènes dans le cadre d'un accord visant à accroître la production et leur présence sur le marché local en Afrique de l'Est et australe pour ravitailler le secteur de la floriculture et de l'horticulture, mais également dans celui des agrumes et d'autres cultures de plein champ. (<http://www.biobestgroup.com/fr/actualites/biobest-sa-pret-a-acquerir-real-ipm-kenya-ltd,02/03/2017>).

Tableau 2.2. Biopesticides à base de *Bacillus spp* et d'autres microorganismes homologués et commercialisés en Afrique subsaharienne.

Nom commercial	Souche	Application	Société	Pays de référence
Shelter	<i>Bacillus subtilis</i> 101	Root and leaf diseases		Afrique du sud,Kenya
Artemis	<i>Bacillus subtilis</i> 102	Root and leaf diseases		Afrique du sud
Avogreen	<i>Bacillus subtilis</i> 246	Root and leaf diseases	Avogen	Afrique du sud
	<i>Bacillus subtilis</i> B246			Afrique du sud
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Root and leaf diseases	Root and leaf diseases	Afrique du sud,Kenya
Florbac 70 DG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> (bacterium)	Giant looper in coffee	Safina (EA) Ltd	Kenya,Afrique du Sud
Xentari WDG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> (bacterium)	Giant looper on coffee	Safina (EA) Ltd	Kenya,Afrique du Sud
Bacticide WP	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Mosquito larvae in breeding sites	Insect (K) Ltd	Kenya,Afrique du Sud

Biolep WP	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (bacterium)	African bollworms on French beans	Insect (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Halt 50 WP	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (bacterium)	Diamondback moth in brassicas and caterpillars on roses	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Thuricide HP	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (bacterium)	Lepidopteran larvae (caterpillars) on vegetables and giant looper on coffee	Farmchem (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Dipel 2X	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> Strain ABTS-351 (bacterium)	Lepidopteran larvae (caterpillars) in coffee and horticultural crops	Safina (EA). Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Dipel DF	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> Strain ABTS-351 (bacterium)	Lepidopteran larvae (caterpillars) (<i>Helicoverpa armigera; Spodoptera exigua</i>) plus leaf-rollers on carnation and roses	Safina (EA). Ltd	Kenya
Avogreen	<i>B. subtilis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> and <i>ercospora</i> spot	Ocean Agriculture	South Africa
Delfin 6.4 WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> Strain SA-11 (bacterium)	C	Farmchem (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Bio-Power 1.15 WP	<i>Beauveria bassiana</i> Strain GNA (fungus)	Aphids and diamondback moth on cabbages	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya
Botanigar ES	<i>Beauveria bassiana</i> Strain GNA (fungus)	Aphids, thrips and whiteflies on French beans and snowpeas	Amiran (K) Ltd	Kenya
Bio-Nematon 1.15 WP	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (fungus)	Root-knot nematodes in French beans, roses and tomatoes	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya
PL-Plus	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (fungus)	Nematodes in roses	Juanco SPS Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Trichotech	<i>Trichoderma asperellum</i> (fungus)	Soil-borne fungal diseases caused by <i>Pythium, Rhizoctonia</i> and <i>Fusarium spp.</i> in French beans	Dudutech (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Rootgard	<i>Trichoderma harzianum</i> Strain 21 (fungus)	Soil-borne diseases (<i>Fusarium spp.</i>) in flowers (carnation)	Juanco SPS Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Trianum-P 11.5 WP	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai Strain KRL-AG2 (T22) (fungus)	Soil-borne fungal diseases caused by <i>Pythium, Rhizoctonia</i> and <i>Fusarium spp.</i> in French beans	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya
Eco-T WP	<i>Trichoderma harzianum</i> Strain k.d. (fungus)	Soil-borne diseases (<i>Fusarium, Pythium</i> and <i>Rhizoctonia</i>)	Lachlan (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
BioCatch 1.15 WP	<i>Verticillium lecanii</i> (fungus)	Aphids and whiteflies on French beans and tomatoes	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya

	Active substances of products	Target pest/disease	Agent / distributor	
--	-------------------------------	---------------------	---------------------	--

BioDewcon 2 WP	<i>Ampelomyces quisqualis</i> (fungus)	Powdery and downy mildew on courgettes and snowpeas	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Bacticide WP	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>	Mosquito larvae in breeding sites	Insect (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
BioDewcon 2 WP	<i>Ampelomyces quisqualis</i> (fungus)	Powdery and downy mildew on courgettes and snowpeas	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya, Afrique du Sud
BioCatch 1.15 WP	<i>Verticillium lecanii</i> (fungus)	Aphids and whiteflies on French beans and tomatoes	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Biolep WP	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> (bacterium)	African bollworms on French beans	Insect (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Bio-Nematon 1.15 WP	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (fungus)	Root-knot nematodes in French beans, roses and tomatoes	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Bio-Power 1.15 WP	<i>Beauveria bassiana Strain GNA</i> (fungus)	Aphids and diamondback moth on cabbages	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya
Botanigard ES	<i>Beauveria bassiana</i> Strain GNA (fungus)	Aphids, thrips and whiteflies on French beans and snowpeas	Amiran (K) Ltd	Kenya
Delfin 6.4 WG	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> Strain SA-11 (bacterium)	Diamondback moth on brassicas and giant looper on coffee	Farmchem (K) Ltd	Kenya
Diglytech	<i>Diglyphus isaea</i> (parasitic wasp)	Leafminers (<i>Liriomyza spp.</i>) on flowers and vegetables	Dudutech (K) Ltd	Kenya
Dipel 2X	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> Strain ABTS-351 (bacterium)	Lepidopteran larvae (caterpillars) in coffee and horticultural crops	Safina (EA). Ltd	Kenya
Dipel DF	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> Strain ABTS-351 (bacterium)	Lepidopteran larvae (caterpillars) (<i>Helicoverpa armigera; Spodoptera exigua</i>) plus leaf-rollers on carnation and roses	Safina (EA). Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Ditera DC	<i>Myrothecium verrucaria</i> (fungus)	Nematodes in ornamentals	Safina (EA). Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Eco-T WP	<i>Trichoderma harzianum</i> Strain k.d. (fungus)	Soil-borne diseases (<i>Fusarium, Pythium and Rhizoctonia</i>)	Lachlan (K) Ltd	Kenya,
Encartech	<i>Encarsia formosa</i> (parasitic wasp)	Whiteflies (<i>Trialeurodes vaporariorum and Bemisia tabaci</i>) in greenhouses	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Ercal	<i>Eretmocerus eremicus</i> (parasitic wasp)	Whiteflies (<i>Trialeurodes vaporariorum and Bemisia tabaci</i>) in greenhouses	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Florbac 70 DG	<i>Bacillus thuringiensis var. aizawai</i> (bacterium)	Giant looper in coffee	Safina (EA) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Halt 50 WP	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> (bacterium)	Diamondback moth in brassicas and caterpillars on roses	Osho Chemical Industries Ltd	Kenya

Nematech	<i>Steinernema feltiae</i> (nematode)	Thrips, leafminers, cutworms and sciariid flies on carnations	Dudutech (K) Ltd	Kenya
Phytoseiulus System	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (predatory mite)	Red spider mites on roses and French beans	Hygrotech (K) Ltd	Kenya
Phytotech	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (predatory mite)	Spider mites (<i>Tetranychus urticae</i>) in vegetables	Dudutech (K) Ltd	Kenya
PL-Plus	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (fungus)	Nematodes in roses	Juanco SPS Ltd	Kenya
Planopar	<i>Coccidoxenoida perminutus</i> (parasitic wasp)	Mealbugs on rose	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya
Real Phytoseiulus	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (predatory mite)	Red spider mites on roses and French beans	Real IPM Company (K) Ltd	Kenya
Rootgard	Trichoderma harzianum Strain 21 (fungus)	Soil-borne diseases (Fusarium spp.) in flowers (carnation)	Juanco SPS Ltd	Kenya
Spical	<i>Amblyseius (Neaseilus) californicus</i> (predatory mite)	Spider mites on rose	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya
Spidex	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (predatory mite)	Spider mites on rose	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Swirski-Mite	<i>Amblyseius swirskii</i> (predatory mite)	Whiteflies on rose	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Thripex	<i>Amblyseius cucumeris</i> (predatory mite)	Flower thrips and spider mites on carnation grown in greenhouses	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Thuricide HP	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (bacterium)	Lepidopteran larvae (caterpillars) on vegetables and giant looper on coffee	Farmchem (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Trianum-P 11.5 WP	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai Strain KRL-AG2 (T22) (fungus)	Soil-borne fungal diseases caused by Pythium, Rhizoctonia and Fusarium spp. in French beans	Koppert Biological Systems (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Trichotech	<i>Trichoderma asperullum</i> (fungus)	Soil-borne fungal diseases caused by Pythium, Rhizoctonia and Fusarium spp. in French beans	Dudutech (K) Ltd	Kenya, Afrique du Sud
Xentari WDG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> (bacterium)	Giant looper on coffee	Safina (EA) Ltd	Kenya, Afrique du Sud

2.1.2. Politique, cadre réglementaire et enregistrement des biopesticides microbiens en Afrique tropical subsaharienne

En dépit du fait que l'on considère que les MBCA (microbial biocontrol agent) ont réduit les impacts négatifs sur l'homme et l'environnement par rapport aux produits chimiques, le consensus est que la MBCA exige une certaine réglementation pour assurer la sécurité et la qualité du produit. Jusqu'à une date récente, les MBCA ne pouvaient être enregistrés en Afrique qu'en utilisant la législation existante, initialement conçue pour les pesticides chimiques. Cependant, les cadres d'homologation conçus pour les pesticides chimiques ne sont pas tout à fait adaptés aux MBCA dont les principaux modes d'action n'entraînent pas toujours un effet toxique. L'absence de réglementation d'enregistrement spécifique a été considérée donc comme un obstacle à la mise en œuvre plus large du MBCA, notamment parce que les données requises représentent jusqu'à 50% des coûts de développement du BCA comparativement à 5% pour un pesticide chimique (Roma et al., 2010, Kabaluk et al., 2010). Dans le cadre de l'enregistrement, les données toxicologiques et écotoxicologiques doivent être générées dans les laboratoires accrédités. Ce type d'installation est encore rare en Afrique et la dépendance qui en découle pour les laboratoires accrédités étrangers augmente le coût de l'enregistrement de la MBCA pour l'Afrique. Cependant, bien que les essais de toxicité et d'écotoxicité dans les laboratoires accrédités dans les pays développés puissent être prohibitifs pour les PME africaines, il existe des laboratoires accrédités ailleurs, qui pourraient entreprendre des tests moyennant des taxes compatibles avec les économies africaines. Une petite, mais importante minorité de pays d'Afrique peut maintenant être en avance sur la tendance en ce sens qu'elle dispose ou est en train d'élaborer des exigences d'enregistrement spécifiques, même avant que la demande généralisée de ces produits n'ait surgi. Au Kenya, par exemple depuis la mise en place des règlements spécifiques, quatre BCA développés par une entreprise Kenyane ont été enregistrés. D'autres entreprises non Kenyanes installées dans d'autres pays de la région ont sollicité également l'enregistrement de leurs produits BCA au Kenya (Kabaluk et al., 2010, Roma et al., 2010).

Dans les pays développés, le contrôle qualité (QC) des MBCA en post-enregistrement est essentiellement régi par l'industrie elle-même et contrôlée par le marché puisque les produits qui ne répondent pas aux exigences des utilisateurs ou des exigences ne seront pas vendus. En Afrique, il existe une certaine réticence pour permettre à l'industrie de se réglementer en ce qui

concerne la qualité du produit final et la crainte que les industries respectent réellement les normes qui protègent les consommateurs contre les produits de mauvaise qualité avec un cadre strict de contrôle qualité des produits après enregistrement. Toutefois ce problème a déjà été abordé dans certains pays, comme le Kenya, où les lignes directrices sur l'enregistrement des BCA ont été récemment élaborées en incluant des exigences spécifiques pour les normes d'assurance qualité (AQ) pendant la production et les normes de qualité pour le produit final. Dans ce cas l'autorité de réglementation n'assure que l'application de l'assurance qualité et du contrôle qualité. L'absence générale d'installations accréditées pour tester les produits frais et la mise en place de mécanismes fiables d'AQ et de QC reste une question importante à traiter dans beaucoup des pays Africains. Au cours de ces dernières années, les partenaires financiers ont apporté leur aide à certains pays africains, tels que les neuf pays membres du CILSS¹ (Comité Permanent Inter de Lutte Contre la Sécheresse au Sahel), dont les membres comprennent le Sénégal, le Mali, le Niger, le Burkina Faso, le Cap, le Tchad, la Mauritanie, la Guinée-Bissau et la Gambie où un cadre réglementaire commun pour les BCA, y compris le MBCA, permet maintenant l'enregistrement dans ces neuf pays avec un dossier unique. Ce cadre s'est référé au modèle Kenyan. Malheureusement on a tendance à imposer des exigences de données inutilement rigoureuses qui augmentent les coûts et imposer des modèles de réglementation occidentaux sans tenir compte du contexte local (Cherry & Gwynn, 2007).

2.2. DESCRIPTION DES MECANISMES D'ACTION DE *BACILLUS spp* DANS LE BIOCONTROLE

2.2.1. Un antagonisme direct

2.2.1.1. Compétition pour les niches écologiques et nutriments

Une fois installé dans la rhizosphère, le micro-organisme d'intérêt peut intervenir favorablement tout d'abord en privant les organismes potentiellement infectieux des ressources nutritives (substrats carbonés, oxygénés, oligoéléments essentiels) et spatiales nécessaires à leur développement, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piano et al., 1997 ; Reyes et al., 2004 ; Jourdain et al., 2010). Sur une base strictement écologique, la concurrence est définie comme un effet associatif dans lequel chaque population affecte négativement l'autre dans la lutte pour les

nutriments, l’oxygène, l’espace ou d’autres besoins communs. L’espèce qui prendra l’avantage sur l’autre dans le cas de la limitation des ressources communes à un rythme plus rapide est davantage susceptible de prédominer. Il a été démontré que les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR pour dire Plant Growth Promoting Rhizobacteria) seraient capables d’exclure les autres micro-organismes (pathogènes) de certaines niches écologiques où la production des exsudats racinaires est importante (Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Kamilova, 2005 ; Lamenceau, 1992). Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piano et al., 1997 ; Reyes et al., 2004 ; Lamenceau, 1992). Par exemple, en 1990, Chet et al. ont trouvé que l’inoculation du sol par *Serratia marcescens* à 10^6 cfu par/gr de sol augmente la densité de la population de cette rhizobactérie à la partie proximale de la racine, alors que la population des *Rhizoctonia solani* diminue significativement. Cependant, cette corrélation entre l’importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n’est, dans certains cas, pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale. En ce qui concerne les nutriments, tels que le carbone, l’azote, l’oxygène, le fer, etc., les micro-organismes se concurrencent entre eux (Alabouvette et al., 2006 ; Faina Kamilova et al., 2005). La concurrence des éléments nutritifs est susceptible d’être la façon la plus commune par laquelle un organisme limite la croissance d’un autre. Mais démontrer qu’elle est responsable de la lutte biologique est assez difficile. Bien que la concurrence entre les bactéries et les agents pathogènes fongiques des plantes pour l’espace ou les nutriments soit connue en tant que mécanisme de lutte biologique depuis de nombreuses années (Whipps, 1997 ; pour les références, John M. Whipps, 2001), le plus grand intérêt a récemment impliqué la concurrence pour le fer. Dans des conditions de limitation du fer, les bactéries produisent une gamme de composés ou des sidérophores chélateurs de fer ayant une très forte affinité pour le fer ferrique. Ces chélateurs de fer bactériens ont la capacité de séquestrer l’offre limitée de fer disponible dans la rhizosphère en le rendant indisponible pour les champignons pathogènes, limitant ainsi leur croissance (O’Sullivan et O’Gara, 1992 ; Loper et Henkels, 1999 ; Pérez-Montaña). La concurrence en fer chez le *Pseudomonas* et les pathogènes a été clairement démontré dans le contrôle des espèces de *Pythium* et *Fusarium*, (Loper et Acheteur, 1991 ; Duijff et al., 1993).

2.2.1.2. Parasitisme et production d'enzymes extracellulaires

Le parasitisme (mycoparatisme) est un mécanisme complexe qui implique généralement la production d'enzymes lytiques des parois cellulaires. Le cas de mycoparasitisme a été observé pour la première fois chez certaines souches de *Trichoderma* vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* et celui de *Coniothyrium minitans* vis-à-vis des sclérotes de *Sclerotinia sp.* (Daami-Remadi, 2001). La colonisation des hyphes et des conidies de l'agent pathogène a été constatée (Yu et al. Sutton, (997). Chen et al. (1998) ont relevé les quatre étapes séquentielles du mycoparasitisme, à savoir : (1) chimiotropisme et reconnaissance, (2) pénétration (3) et enroulement de la paroi cellulaire, (4) digestion de la cellule hôte. Celui-ci implique donc une reconnaissance de l'hôte, c'est-à-dire de l'agent pathogène par l'agent de lutte biologique, une pénétration des hyphes de ce dernier dans les propagules (hyphes, conidies, sclérotes) suivie d'une lyse du cytoplasme.

L'implication des enzymes dans l'inhibition des pathogènes est référencée comme l'une des caractéristiques les plus importantes des mycoparasitismes utilisés dans la lutte biologique, mais elle brouille la distinction entre le parasitisme et l'antibiose. Plusieurs bactéries produisent et sécrètent des enzymes lytiques capables d'hydrolyser et de dégrader la chitine, les protéines, la cellulose, l'hémicellulose, le B-1-3 lucane et l'ADN en tant que constituant majeur de la paroi cellulaire des champignons et des oomycètes, contribuant ainsi à la suppression directe des pathogènes (D. Praveen Kumar et al., 2012 ; Chaur-Tsuen Lo, 1998 ; Meenu Saraf, 2013). N. Ashwini et S. Srividya (2013) ont montré qu'une souche de *B. subtilis* isolée dans la rhizosphère du piment de Bangalore était capable de provoquer la lyse des mycéliums et la mort de *Collectorotricum gloeosporioides* OGC grâce à la production d'enzymes mycolytiques comme les cellulases, les glucanases ou la chitinase, contrairement au mutant non producteur de ces enzymes. Oana-Alina Sicula et al. (2015) ont caractérisé une collection de souches de *B. subtilis/amyloliquefaciens* produisant des enzymes comme la chitinase, les cellulases, les protéases, la lipase, l'amylase ou la décarboxylase impliquées dans l'activité pour causer les dommages et la mort des cellules de *Phythium* et *Phytophtora spp.* Bien que le parasitisme soit un élément de lutte contre les pathogènes des plantes, l'usage d'hyperparasites en lutte biologique présente des contraintes, comme la nécessité d'un contact direct avec l'agent pathogène ou la lenteur possible de la destruction de ce dernier (Fravel, 2005).

2.2.1.3. Antagonisme par des composés volatils

Les souches microbiennes capables de produire de façon permanente des composés volatils (COVs) présentant une activité inhibitrice des pathogènes des plantes ont récemment reçu une attention particulière (Andersen et al., 1994 ; Xing-Yu Li et al., 2015 ; Liu W. et al., 2008 ; Fernando et al., 2005). Ces micro-organismes antagonistes comprennent les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* ainsi que les champignons non pathogènes *Trichoderma*. La libération des composés volatils (COVs) par ces microbes du sol a été signalée pour promouvoir la croissance des plantes, une activité nématicide et l'induction d'une résistance systématique chez ces dernières (Katrín Wen et al., 2009 ; Marco Kai, 2008). Les chercheurs ont également constaté que les COVs produits par les bactéries pourraient également inhibiter la germination des spores des champignons pathogènes. Xing-Yu Li et al. (2015) ont démontré dans leur récent travail que huit souches de *B. subtilis* XF-1 (XF-1), *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* FZB42 (FZB42), *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* YAU B9601-Y2 (Y2), *B. subtilis* 168 (168) et *Bacillus* spp. (033, 041, 355 et 285) sont capables d'inhiber entre 56 et 82 % de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* grâce aux COVs qu'elles produisent, après un test bioessai dans des boîtes scellées et divisées en compartiments. Après extraction et analyse de ces COVs par chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse, ils ont constaté que les composés détectés supposés agir sur les pathogènes sont pour la plupart des alcools, les cétones, les aldehydes, les pyrazines, les esters, les pyridines et les composés benzéniques. Au contraire, une expérience menée récemment par Cawoy et al. (2015) a révélé que l'inhibition des pathogènes par *Bacillus amyloliquefaciens* (S499) n'est pas liée aux COVs émis par cette souche, mais plutôt aux lipopeptides produits par celle-ci, notamment les fengycines et les iturines.

2.2.1.4. Antagonisme par antibiose

L'antagonisme par antibiose repose essentiellement sur la production, par l'agent de lutte, des métabolites secondaires de nature diverse exerçant un effet毒ique sur l'agent pathogène à de faibles concentrations (tableau 1). Elle est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les *Bacillus* en tant que PGPR pour limiter l'invasion des pathogènes dans les tissus de la plante hôte (Jacobsen, 2006). Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production des métabolites et/ou antibiotiques aux

propriétés antifongiques (Jacobsen, 2006, Munees Ahemad et Mulugeta Kibre., 2013, Stephanie Diallo, 2011, Jacobsen, 2006 ; Haas et Kell, 2003). L'antibiose est un cas d'antagonisme direct des phytopathogènes qui joue un rôle clé dans le biocontrôle et dépend de la production efficace d'antibiotiques. Certaines espèces de *Bacillus*, telles que *B. subtilis* ou *B. amyloliquefaciens*, peuvent consacrer jusqu'à 8 % de leur matériel génétique à la synthèse d'un large éventail de composés antimicrobiens, parmi lesquels les enzymes lytiques, les antibiotiques, une gamme de (lipo) peptides synthétisés selon les mécanismes non ribosomiaux et les polykétides (Chen et al., 2009 ; Rückert et al., 2011 ; Cawoy et al., 2015). Parmi ces antibiotiques, certains comme les surfactines interviennent aussi dans la colonisation des racines et la formation des biofilms qui permettent aux bactéries de se fixer sur divers substrats et de résister aux conditions défavorables de l'environnement. Un tel arsenal d'antibiotiques et une aptitude élevée à coloniser les racines expliquent probablement le fort potentiel de biocontrôle des bacilles à la fois *in vitro* et dans des conditions naturelles au champ, et son succès en tant que produit commercialisé (Cawoy et al., 2011 ; Larkin et Tavantzis, 2013 ; Shen et al., 2013, Jun Weng, 2013). Parmi l'antibiome de *Bacillus*, les lipopeptides cycliques (cLPS) appartenant aux familles des surfactines, des iturines et des fengycines présentent un grand intérêt non seulement parce qu'ils sont produits à des taux élevés par des cellules *B. subtilis/amyloliquefaciens* dans des conditions *in vitro* au sein de bioréacteurs, mais aussi parce qu'ils sont aussi les principaux agents antimicrobiens pouvant être sécrétées en quantités biologiquement pertinentes dans des conditions naturelles de croissance des plantes à l'intérieur de la rhizosphère (Kinsella et al., 2009 ; Debois et al., 2014 ; Cawoy et al., 2014). *B. cereus* UW85 produit deux antibiotiques fongistatiques, la zwittermicine A et la kanosamine, qui ont eu des effets sur la suppression de *Phytophthora medicaginis* sur la luzerne (Silo-Suh et al., 1994), la zwittermicine A peut également contrôler la pourriture des fruits du concombre (Smith et al., 1993) et supprimer d'autres maladies des plantes (Silo-Suh et al., 1998). Le bacillaène, la difficidine et la macrolactine sont des polykétides présentant un large spectre d'activités antibactériennes qui peuvent être impliquées dans l'activité de biocontrôle de la souche contre diverses maladies bactériennes comme le feu bactérien, une maladie grave des vergers causée par *Erwinia amylovora* sur des arbres fruitiers (Chen et al., 2009).

2.2.2. Antagonisme indirect/Induction de résistance

L’antagonisme indirect faisant appel aux réactions de défense a été mis en évidence plus récemment, et fait actuellement l’objet des nombreux travaux de recherche les plus prometteurs (Cawoy et al., 2014). Aux côtés de l’antibiose, il constitue l’un des mécanismes les plus exploités en lutte biologique contre les pathogènes des plantes. Il est maintenant bien démontré que la plante répond à tous les stress d’origine biotique ou abiotique par une cascade de signaux moléculaires qui tendent à renforcer sa résistance. Ces réactions de défense se manifestent aussi bien en réponse à l’attaque d’un agent pathogène qu’à celle d’un agent antagoniste ou de molécules dites électriques. Il est déjà démontré que les PGPR sont aussi capables de stimuler la défense des plantes. Cette « **immunité** » s’initie en principe suite à la perception par la plante de molécules dites « **élicitrices** » produites par le micro-organisme bénéfique. Ce phénomène fait appel séquentiellement à la reconnaissance par l’hôte d’éliciteurs produits par l’agent inducteur, à l’émission d’un signal requis pour propager l’état induit de manière systémique et à l’expression de mécanismes de défense *stricto sensu* qui permettent de limiter la pénétration du pathogène dans les tissus de la plante.

L’ISR se fait de manière systémique par tous les organes de la plante contre divers pathogènes. Selon Van Loon et Bakker (2005), l’effet protecteur de l’ISR est similaire à celui établi par la SAR, un mécanisme de défense produit par la plante suite à l’infection par un pathogène. Mais, au contraire de la SAR, l’ISR ne provoque pas de symptômes visibles de la maladie. Tout comme dans le cas de la SAR, phénotypiquement, l’expression/manifestation du phénomène de l’ISR se déroule en quatre étapes : i) la perception par la plante des molécules d’origine bactérienne responsables de l’élicitation du phénomène, ii) la transmission du signal nécessaire à la systématisation du phénomène dans la plante, iii) la mise en alerte de la plante au niveau systémique, qui, dans la plupart des cas, n’est pas accompagnée de modifications majeures de l’activité transcriptionnelle avant l’attaque du pathogène et iv) l’expression du ou des mécanisme(s) de défense *stricto sensu* induits permettant de limiter, voire d’inhiber, la pénétration du pathogène dans les tissus de l’hôte.

Trois molécules sont actuellement reconnues pour leur implication dans la transduction du signal en relation avec l’ISR : l’acide salicylique (SA), l’acide jasmonique (JA) et l’éthylène (ET). Même si l’AS est généralement associé à l’établissement de la SAR, son implication dans l’ISR a été aussi démontrée dans certaines interactions plantes-pathogènes-rhizobactéries. C’est le cas par exemple du tabac et de la tomate, chez qui une accumulation de SA suite au traitement

par *Pseudomonas aeruginosa* a été démontrée par Höfte et Bakker (2007). Les molécules de défense comprennent les phytoalexines, les protéines liées à la pathogénèse (PR) (comme les chitinases, les β -1,3-glucanases, les inhibiteurs de protéinase, etc.) et la lignine pour le renforcement des parois cellulaires (Van Loon, 2007). L'épaississement des parois cellulaires ou la mort rapide des cellules végétales lésées résultant en une nécrose immédiate (réaction s d'hypersensibilité) sur les tissus adjacents sont des barrières qui coupent l'agent pathogène de ses nutriments et contribuent à ralentir l'invasion fongique (Lugtenberg et al., 2002). En raison de sa systémicité, la capacité de défense renforcée s'exprime aussi bien dans les racines que dans les feuilles. La lutte contre les maladies causées par les champignons, les bactéries et les virus a été clairement démontrée, mais l'ISR peut également constituer une stratégie efficace de lutte contre les nématodes et les insectes nuisibles dans plusieurs cultures. Les ISR à activité rhizobactérienne ne confèrent pas une protection totale contre l'infection pathogène, mais comme le phénomène est durable et ne favorise pas le développement de la résistance aux pathogènes (multiplicité et variété des voies de défense induites), il est considéré aujourd'hui comme une prometteur et certaines expériences menées sur le terrain ont mis en évidence le rôle de l'ISR dans le contrôle des pathogènes. Jusqu'à présent les composés volatils tels que le 2,3-butanediol et les lipopeptides sont les seuls composés formés par *Bacillus spp.* qui ont été identifiés comme éliciteurs de ISR chez les plantes (Ryu et al., 2004 , Cawoy et al.,2014). Le potentiel des *Bacillus* en tant qu'inducteurs de résistance des plantes a été démontré en testant des surfactines et des fengycines purs qui ont fourni un effet protecteur induit significatif semblable à celui induit par les cellules vivantes de la souche productrice (*B. amyloliquefaciens* S499). Dans une approche complémentaire, des expériences menées sur le haricot et la tomate ont montré que la surexpression des gènes de biosynthèse de la surfactine et de la fengycine dans la souche 168 de *B. subtilis* naturellement pauvre était associée à une augmentation significative du potentiel des dérivés pour induire une résistance (Cawoy et al., 2012, 2015). De plus, la réduction macroscopique de la maladie induite par le surproducteur de surfactine a été associée à des modifications métaboliques liées à la défense dans les tissus végétaux hôtes (Ongena et al., 2007).

2.3. AUTRES MECANISMES DES *BACILLUS spp.*

2.3.1. *Interférence avec le pouvoir pathogène*

Durant la première phase de l'interaction entre la plante hôte et le pathogène, la synthèse d'enzymes hydrolytiques est cruciale pour le processus d'infection. C'est le cas avec, par exemple, *B. cinerea* (Baarlen et al., 2004). Les agents de lutte biologique, dont certaines souches de *Bacillus spp.*, peuvent interférer avec les facteurs de virulence de champignons en inhibant ou en dégradant certaines enzymes hydrolytiques constituant la paroi des champignons, comme la cutinase, la pectinase, etc. (Duffy et al., 2003). L'interférence avec le pouvoir pathogène a été observée chez *Bacillus circulans*. Paul et al. (1997) ont montré que la bactérie *Bacillus circulans* réduit *in vitro* l'activité pectinolytique de *B. cinerea* et, en conséquence, son infection sur la vigne. Certains micro-organismes utilisés en lutte biologique *Bacillus pumilus* ou *P. fluorescens* modifient le pH du milieu (Swadling et Jeffries, 1998) peuvent avoir un effet indirect sur la mise en place de la pathogenèse en modifiant par exemple le pH du milieu. L'activité pectinolytique de *B. cinerea* est optimale à un pH acide (Manteau et al., 2003 ; Schoonbeek et al., 2007). Des pH alcalins entraînent une réduction de l'efficacité des enzymes de dégradation des tissus de la plante produites par *B. cinerea* (Manteau et al., 2003).

2.3.2. *Modification des propriétés de surface de la feuille*

Certaines bactéries possèdent la capacité de changer les caractéristiques de surface des feuilles des plantes et, dès lors, de gêner le processus d'attachement et de croissance des agents pathogènes sur les feuilles (Bunster et al., 1989). C'est le cas par exemple de certains micro-organismes comme *Pseudomonas spp.* qui sont aptes à modifier la mouillabilité de la surface des feuilles et à interférer ainsi avec le développement de certains agents pathogènes (Bunster et al., 1989). Edwards et Seddon (1992) ont démontré que *Bacillus brevis* entraîne l'extension et le dessèchement des gouttes d'eau sur les feuilles de chou chinois, diminuant ainsi les périodes d'humidité sur les feuilles et empêchant ainsi l'apparition de conditions favorables pour le développement de *B. cinerea*. Il a été démontré également que l'inoculation des feuilles ou des racines des plantes peut moduler la fermeture ou l'ouverture des stomates et empêcher la pénétration du pathogène. Amutha Sampath Kumar et al. (2012) ont découvert que l'inoculation des racines et des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* par *B. subtilis* strains FB17, GB03 ou BS168 induit la fermeture des stomates après une heure pour éviter que le pathogène

Pseudomonas syringae infecte les racines, les feuilles et provoque la SAR chez la plante. En utilisant les mutants dépourvus d'ABA, de SA, de JA et d'ET comme voie de transduction du signal, ils observent que la fermeture des stomates induite par le *Bacillus* est médiée principalement par le SA et l'ABA.

2.4. EFFETS BENEFIQUES DES *BACILLUS* SUR LA CROISSANCE DES PLANTES ET L'AMELIORATION DU SOL

2.4.1. *Colonisation des racines*

Dans l'interaction micro-organismes-plante, la capacité des rhizobactéries à coloniser les racines des plantes est un atout très important (Lugtenberg et al., 2002, Kamilova et al., 2005 ; E. Benizri et al. 2001). Cette interaction a lieu dans la tranche du sol exploitée par les racines, la **rhizosphère**. Ainsi, on distingue en général le **rhizoplan**, qui est l'interface racine/sol, et le sol rhizosphérique, situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence. Ce sont des régions d'activité microbienne intense. La spermophère est une zone critique, car la colonisation des semences est la première étape à la colonisation des racines. Les micro-organismes qui s'établissent sur les graines au moment de la germination peuvent se multiplier et coloniser les racines sur toute leur longueur dès qu'elles émergent et croissent dans le sol. La colonisation de la semence en phase d'imbibition prédispose de la future colonisation des racines et impacte considérablement la croissance des plantes. La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance. Et, à l'inverse, elle libère les composés organiques nécessaires à la croissance des bactéries.

Les rhizobactéries étant des hétérotrophes typiques, elles ont besoin des composés organiques du sol et de ceux largués par les racines des plantes comme source d'énergie. La quantité et la composition des exsudats racinaires influencent également la nature des activités bactériennes. Ces dernières résultent de la synthèse de métabolites tels que les antibiotiques, les sidérophores, les substances de croissance (hormones), l'acide cyanhydrique ou les lipopolysaccharides (Voisard et al., 1989 ; Van Peer et al., 1991). Cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante et de la fréquence des infections fongiques de la racine (Kloepper, 1993). Les biofilms sont responsables de l'attachement et de l'agrégation des microcolonies des bactéries sur les racines (Ramey et al., 2004). En ce qui concerne l'implication des lipopeptides de *Bacillus* dans la colonisation des racines, les études de Peypoux et al. (1999) et de Kinsinger

et al. (2003) ont souligné le rôle des surfactines et non pas des fengycines ou des iturines dans la formation des pellicules dans l'interface eau-air. Bais et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle des surfactines dans la formation d'un biofilm stable de la souche *B. subtilis* 6051 sur les racines d'*Arabidopsis* (Bais et al., 2004 , Bais et al. 2006, Rosalie Allard-Massicotte et al., 2016), alors qu'Ahimou et al., 2000 ont observé que la suppression de l'expression des surfactines dans cette souche diminue le taux de colonisation et le biocontrôle de la maladie causée par *Pseudomonas syringae* (Ahimou et al., 2000). Le déplacement des colonies bactériennes sur la racine pour atteindre la niche la plus riche en nutriments s'effectue par le phénomène du « *swarming* » dépend également de la production des biosurfactants (Raaijmakers et al., 2006 ; Daniels et al., 2004).

2.4.2. Effets des *Bacillus* sur l'amélioration de l'agrégation et la stabilité structurale du sol

La structuration et la stabilité des agrégats du sol déterminent les propriétés mécaniques et physiques de ce dernier. Ce sont deux facteurs déterminants pour la germination des graines et la croissance racinaire (Chenu et Stotzky, 2002). Les micro-organismes rhizosphériques (bactéries, algues, champignons) contribuent énormément à la structure du sol. Les micro-organismes, modifient l'arrangement des particules du sol (structure) ainsi que leur stabilité (agrégation) (C. Chenu et G. Stotzky, 2002). La principale contribution des micro-organismes rhizosphériques à l'agrégation est liée à la production de sécrétions extracellulaires (Tisdall, 1994 ; Chenu et Stotzky, 2002 ; Wingender et al., 1999). Ces sécrétions sont un mélange complexe de polymères, comme les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques ou les lipides (Wingender et al., 1999). Selon Tsuneda et al. (2003), d'un point de vue physicochimique, les sécrétions extracellulaires qui recouvrent les surfaces cellulaires peuvent être perçues comme des polyélectrolytes adsorbés sur des particules colloïdales (Tsuneda et al., 2003). Dans le milieu tropical où les sols sont souvent argileux et hydromorphes, les rhizobactéries peuvent contribuer à la décomposition de la matière organique et faciliter l'aération du sol. L'inoculation du sol avec des souches bactériennes productrices de polysaccharides a permis de démontrer les rôles des *Bacillus* et d'autres micro-organismes dans l'agrégation et la stabilité des sols. Divers chercheurs ont testé plusieurs souches bactériennes et sur plusieurs types de sol rhizosphérique. On peut citer par exemple l'inoculation des racines de tournesol par une souche de *Rhizobium sp.* (productrice de YAS34) dans un sol français (Alami, 1999 ; Y. Alami et al., 2000, Yahia Kaci, 2005) ; l'inoculation des racines de blé par la souche *Pantoea agglomerans* (productrice de NAS206) dans un vertisol marocain (Amellal et

al., 1998), par une souche *Paenibacillus polymyxa* (productrice de lévane) (Bezzate et al., 2000), par une souche *Rhizobium sp.* (Productrice de KYGT207) dans un sol algérien, ou par d'autres souches comme l'*Aeromonas hydrophila/caviae* (productrice de MAS765), le *Bacillus insolitus* (productrice de MAS17) ou le *Bacillus sp.* (productrice de MAS617, MAS620 et MAS820) dans des sols pakistanais (Ashraf et al., 2004 ; Dulce, 2006). Récemment, Borris (2001) a montré que le gène SacB de la synthèse de la levane est impliqué aussi dans l'adhérence des sols aux racines et que son agrégation est présente dans la souche *B. amyloliquefaciens* FZB42.

2.4.3. Solubilisation du phosphore

Même si le sol est riche en phosphore, ce minéral n'est pas toujours disponible pour les plantes, une grande quantité se présentant sous forme insoluble. Certaines bactéries ont la capacité de le solubiliser dans la rhizosphère. Elles peuvent ainsi être utilisées pour résoudre ce problème du phosphore. On les appelle Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) (Vessey, 2003). L'action de ces micro-organismes résulte de la minéralisation du phosphore organique et de la solubilisation du phosphore précipité dans le sol (Kucey et al., 1989 ; Pradhan et Sukla, 2005). Cette qualité ne fait que les rhizobactéries comme les *Bacillus spp.* pourraient être des biofertilisants prometteurs dans l'agriculture (Sharma et al., 2007). Le mécanisme principal est la production d'acide organique (Sharma et al., 2007), gluconique et 2-cétogluconique, lactique, isovalérique, isobutyrique et acétique. La libération de ces acides mobilisant le phosphore grâce aux interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduit à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement, et, par conséquent, à la libération du phosphate sous forme ionique. (Kumar et Narula , 2001 ; Whitelaw, 2000 ; Gyaneshwar et al., 2002, Khan, 2007). Selon Subbarao (1988) et Kucey et al. (1998), parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas spp.* (Subbarao, 1988 ; Kucey et al., 1989). *B. megaterium*, *polymyxa*, *circulans*, *coagulans*, *subtilis* et *sircalmous* sont les plus performantes (Podile et Kishore, 2006) dans la solubilisation des phosphates. Par exemple, *B. megaterium* a la capacité d'améliorer la nodulation, le rendement et l'absorption des nutriments dans la culture du soja (Son et al., 2006 ; Sharma et al., 2007). Tandis qu'Yazdani et al. (2009) ont démontré que la co-innoculation de *Bacillus spp.* avec d'autres souches PGPR réduit la demande en phosphore, de la part de la culture du maïs, de 50 %.

2.4.4. Fixation de l'azote

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lesquels les plantes exercent une interaction positive avec les micro-organismes. L'un des avantages des bactéries est de fournir l'azote aux plantes en échange du carbone libéré par les exsudats racinaires. Cependant, il faut rappeler que la disponibilité du carbone comme source d'énergie est requise pour la fixation intensive de l'azote. Ceci impose aux bactéries de vivre près des plantes dans la rhizosphère, le rhizoplan ou comme endophytes. Les micro-organismes à associations symbiotiques produisent 80 % de l'azote. Le reste provient des systèmes libres ou associés (Graham, 1988). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (Saxena et Tilak, 1998). Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures des non-légumineuses, comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, la pomme de terre ou le blé (Dobereiner, 1997 ; Hecht-Buchholz, 1998 ; Sahin et al., 2004). Les plus importantes bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques appartiennent à différentes espèces : *Azoarcus sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*. De nombreuses expériences menées dans les serres et sur terrain ont démontré que l'inoculation des semences par les *Bacillus spp.* réduit de façon significative le besoin de beaucoup d'espèces végétales en fertilisants azotés (Bashan et Levanony, 1990 ; Bashan et al., 2004, Y. Ding et al., 2004). Récemment, Yao et al. (2006) ont démontré dans des essais complets sur le terrain menés pendant plusieurs années la capacité du *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 à augmenter le rendement (de 7,5 à 10 %) des cultures de la pomme de terre, du coton et du maïs. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque les *Bacillus* étaient appliqués aux tubercules en combinaison avec les engrains chimiques. Il semble donc que l'inoculation des semences avec certaines souches de rhizobactérie peut augmenter le rendement des cultures et diminuer les dépenses en engrains azotés (Yao et al. 2006).

2.4.5. La phytostimulation

Les différentes étapes de la croissance et du développement des plantes, telles que l'elongation ou la division cellulaire, la différenciation tissulaire ou la dominance apicale sont régulées par

des hormones. Selon Spaepen et al. (2007), les hormones de croissance sont des substances qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations et qui contrôlent un ou plusieurs événements spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales servent aussi de messagers chimiques affectant la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que l'utilisation des hormones en tant que molécules de signal n'est pas destinée seulement aux plantes, elle participe également à la communication entre les bactéries et d'autres micro-organismes. De nombreuses souches de *Bacillus* sont dotées de la capacité à produire les hormones de croissance, telles que les auxines, les cytokinines ou les acides gibbérelliques, et à abaisser le taux d'éthylène chez la plante (Rubén Bottini et al., 2004, Glick, 1995 ; Lucy et al., 2004, Randy Ortíz-Castro et al., 2008). Par exemple, l'amélioration de la croissance des plantes par la colonisation racinaire avec des espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* productrices d'AIA est bien connue (Kloepper et al., 2004). La capacité des bactéries à synthétiser les gibbérellines a été initialement décrite chez *A. brasiliense* (Tien et al., 1979) et le *Rhizobium* (Williams Sicardi de Mallorca, 1982), puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia* et *Xanthomonas* (Mitter et al., 2002 ; Tsakelova et al., 2006 ; Joo et al., 2009). La promotion de la croissance des plantes par les PGPR productrices de gibbérellines est rapportée par plusieurs travaux et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux (Atzhorn et al., 1988 ; Gutierrez-Manero et al., 2001 ; Joo et al., 2009). Il a été démontré également que les PGR (*Bacillus*) ont la capacité et les potentialités d'augmenter le nombre et / ou la longueur des racines latérales (Combes-Meynet et al., 2011; Chamam et al., 2013), stimuler l'elongation des racines *in vitro* et *in vivo* (Dobbelaere et al., 1999; Contesto et al., 2008) et par conséquent l'augmentation de la biomasses des racines ,des parties aériennes de la plante et du rendement (El Zemrany et al., 2006).

2.5. LES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES LIPOPEPTIDIQUES DE *BACILLUS* : STRUCTURES ET RÔLES DANS LA LUTTE BIOLOGIQUE

2.5.1. Importance des lipopeptides

Parmi le groupe d'antibiotiques cités sous-utilisés, les lipopeptides cycliques (cLPS) représentent une classe prometteuse de produits naturels avec une activité antimicrobienne puissante. Aujourd'hui ces lipopeptides ont des applications cliniques, cosmétiques, dans la préservation des aliments, des produits laitiers, en industrie pétrochimique et le contrôle des maladies des plantes. La demande en lipopeptides est également aussi en augmentation en raison de leur utilité pour le bien-être humain. Les lipopeptides ont été approuvés aux États-Unis en tant qu'antibiotiques en 2003. Le daptomycine est le premier antibiotique lipopeptidique cyclique à être approuvé aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des infections graves du sang et de la peau causées par certains microorganismes à Gram positifs (Meena et Kanwar, 2015). On estime aujourd'hui que les lipopeptides pourraient constituer un chiffre d'affaire d'un milliard de dollars et leurs utilisations dans des domaines variés de l'agriculture, de la pharmacie et de l'industrie cosmétique a été approuvée dans plus de 70 pays (Meena et Kanwar, 2015). Parmi les lipopeptides, les lipopeptides cycliques (cLPs) ont fait l'objet de plusieurs revues récentes qui couvrent des aspects de leur diversité structurale et de leur activités biologiques (Nielsen et al., 2002, Raaijmakers et al., 2006), leur biosynthèse (Kleinkauf et von Döhren, 1987), leur production en fermenteur (Shaligram et Singhal, 2010), leur régulation naturelle (Raaijmakers et al., 2010). Ces molécules ont été détectées dans plusieurs genres bactériens, principalement les *Bacillus*, les *Pseudomonas*, les *Streptomyces*, ainsi que dans les champignons. Plusieurs lipopeptides caractérisés jusqu'à ces jours ont montré diverses activités surfactant, antimicrobien et cytotoxique, antitumoral, immunosuppresseur (Raaijmakers et al., 2010). Bien que les *Bacillus* produisent plusieurs antibiotiques selon les souches, les principaux lipopeptides excrétés par l'espèce bactérienne peuvent être classés en trois principales familles: les surfactines, les iturines et les fengycines (Fig 2.1) selon leurs rôles en lutte biologique contre les maladies des plantes.

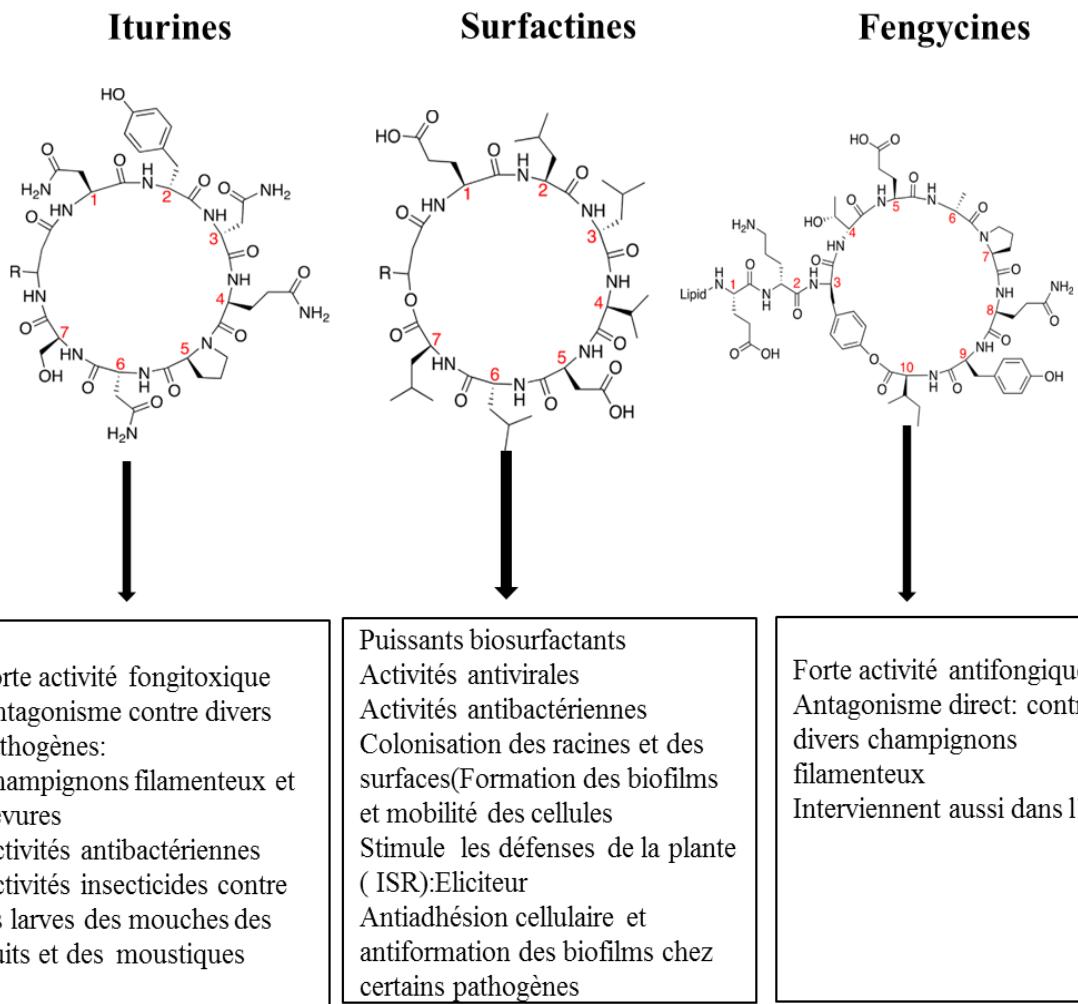


Fig. 2.1. Trois principales familles de lipopeptides

2.5.2. Biosynthèse des lipopeptides par *Bacillus*

Les lipopeptides sont synthétisés par des peptides non ribosomaux synthétases (NRPSs) par le processus de «thiotemplate». En effet cette voie indépendante du ribosome utilise des complexes multi-enzymatiques qui permettent une synthèse peptidique dite «**non ribosomale**». Ces enzymes appelées «**non ribosomal peptides synthétase (NRPS)**», sont des enzymes de grande taille et sont organisées en modules. Ce sont des grands complexes qui représentent à la fois la matrice et jouent un rôle comparable à celui de l'ARNm dans la voie classique, mais aussi dans la machinerie biosynthétique, une fonction effectuée par les ribosomes et les ARNt au sein de la synthèse protéique classique (Caboche, 2009, Meena et Kanwar, 2015). En revanche, les polyketides synthétase (PKS) et les acides gras synthétases

interviennent aussi dans la synthèse de la famille des iturines par le processus de «PKS/NRPS template» (Tsuge et al., 2001; Hansen et al., 2007). Bien que différentes, ces deux parties possèdent un point commun : une organisation modulaire où chaque composant interagit avec les modules adjacents et/ou divers cofacteurs. Contrairement à la voie de synthèse protéique ribosomale, qui n'utilise que les 20 acides aminés de base (plus quelques exceptions) pour produire des peptides, le mécanisme de NRPS en utilise plus de 300 (D-amino acids, N-méthylés).

2.5.3. Structures et classification des lipopeptides de *Bacillus* spp

En ce qui concerne la structure générale, les lipopeptides sont des molécules qui renferment un cycle peptidique composé de 7 ou 10 résidus d'acides α -aminés L ou D, relié à un acide gras β -hydroxylé ou β -aminé à une longue chaîne carbonée. Ce sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles ont des affinités avec l'eau. En effet, leur partie peptidique est plutôt soluble dans l'eau (hydrophile) et leur partie lipidique est plutôt soluble dans l'huile (partie hydrophobe ou lipophile). Cette particularité a des conséquences sur les propriétés physico-chimiques de ces molécules mais aussi sur leurs activités biologiques. Certaines molécules telles les surfactines sont ainsi de puissants surfactants (agents moussants ou émulsifiants). Ongena et Jacques (2009) ont pour la première fois mis en évidence la propriété de ces molécules en relation avec le biocontrôle. Pour chaque famille, on distingue des isoformes, se différenciant par la nature des acides aminés dans le cycle, et des homologues, qui varient suivant la longueur (de 13 à 18 atomes de C) et l'isométrie (linéaire, iso ou antéiso) de la chaîne lipidique (Tableau 2.3).

Tableau 2.3. Les lipopeptides de *Bacillus* et leurs homologues.

Lipopeptides	Séquences peptidiques					Acides aminés	
Iturin A	l-Asn	l-Gln	l-Pro	d-Asn	l-Ser	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , nC ₁₁	
Mixirin	l-Asn	l-Gln	l-Ser	d-Asn	l-Pro	(A) C ₁₁ , (B) C ₈ , (C) aiC ₁₀ (CH ₂) ₄ HC	
Subtulene A	l-Asn	l-Gln	l-Pro	d-Asn	l-Ser	=CH(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	
Iturin C	l-Asp	l-Gln	l-Pro	d-Asn	l-Ser	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , nC ₁₁	
Mojavensin A	l-Asp	l-Gln	l-Pro	d-Asn	l-Asn	aiC ₁₂	
Bacillomycin	l-Asn	l-Pro	l-Gln	d-Ser	l-Thr	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , nC ₁₁	
Bacillomycin F	l-Asn	l-Gln	l-Pro	d-Asn	l-Thr	aiC ₁₃ , iC ₁₃ , nC ₁₂	
Bacillomycin L	l-Asp	l-Ser	l-Glu	d-Ser	l-Thr	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , nC ₁₁ iC ₁₃ , aiC ₁₂ , iC ₁₂ , nC ₁₁	
Bacillopeptine	l-Asn	l-Ser	l-Glu	d-Ser	l-Thr		
Fengycin A ₁	d-Tyr	^{d-} ^a Thr	d-Ala	l-Tyr	l-Ile	C ₁₄ -C ₁₉	
Fengycin B ₁	d-Tyr	^{d-} ^a Thr	d-Val	l-Tyr	l-Ile	C ₁₄ -C ₁₇	
Fengycin B ₂	d-Tyr	^{d-} ^a Thr	d-Val	l-Tyr	l-Val	C ₁₄ -C ₂₁	
Fengycin C ₂	d-Tyr	^{d-} ^a Thr	d-Val	l-aThr	l-Ile	C ₁₄ -C ₁₈	
Fengycin S	d-Tyr	d-Ser	d-Val	l-Tyr	l-Ile	C ₁₇	
Plipastatin A ₁	l-Tyr	^{d-} ^a Thr	d-Ala	d-Tyr	l-Ile	nC ₁₆	
Plipastatin B ₁	l-Tyr	^{d-} ^a Thr	d-Val	d-Tyr	l-Ile	nC ₁₆	
						Acides aminés	
[Ala4] surfactin	l-Glu	l-Leu	d-Leu	l-Ala	l-Asp	l-Leu	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , iC ₁₁ , nC ₁₁
[Ile4] surfactin	l-Glu	l-Leu	d-Leu	l-Ile	l-Asp	l-Leu	aiC ₁₂
[Val7]Pumilacidin B, D	l-Glu	l-Leu	d-Leu	l-Val	l-Asp	l-Val	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , iC ₁₁ , nC ₁₁ , aiC ₁₄ , iC ₁₄ , iC ₁₃ , nC ₁₃
[Ile2, 4] surfactin	l-Glu	l-Ile	d-Leu	l-Ile	l-Asp	l-Leu	aiC ₁₂
[Val2, 7] surfactin	l-Glu	l-Val	d-Leu	l-Val	l-Asp	l-Val	C ₁₀ -C ₁₂
[Ile2, 4, 7] surfactin	l-Glu	l-Ile	d-Leu	l-Ile	l-Asp	l-Ile	aiC ₁₂
Lichenysin	l-Gln	l-Leu	d-Leu	l-Val	l-Asp	l-Ile	aiC ₁₂ , iC ₁₂ , nC ₁₁ , aiC ₁₁ , iC ₁₁ , nC ₁₂

Les surfactines.

La famille des surfactines englobe les variantes héptapeptidiques d'esperine, la lichenysine, la pumilacidine et la surfactine. Le cycle héptapeptidique est directement lié à une longue chaîne hydrocarbonée (C12-C16), par une liaison ester interne entre la fonction hydroxyle de l'acide

α -amine C-Terminal, la D-Tyr et la fonction carboxyle de la D-allo Thr. Le type de surfactine peut également varier en fonction de l'ordre des acides aminés et de la taille de la portion lipidique (Korenblum et al., 2012). Habituellement les isoformes des surfactines coexistent dans la cellule comme un mélange de plusieurs variantes peptidiques avec une chaîne aliphatique de longueur différente. Le modèle des acides aminés et des acides gras β -hydroxyle dans la molécule de surfactine dépend non seulement de la souche bactérienne productrice, mais aussi du type de conditions de culture (Seydlová, 2011). Les acides aminés LGlu et LAsp renforcent le caractère amphiphile (peptide hydrophile + lipide hydrophobe) responsable de ses propriétés tensioactives. La production de cette molécule chez *B. subtilis* s'effectue normalement en fin de phase exponentielle de croissance. Les surfactines sont reconnues comme ayant des propriétés antibactériennes, antivirales, antitumorales, hypocholestérolémiantes, antifongiques, antimycoplasmiques et inductrices des mécanismes de résistance des plantes contre les pathogènes (Volllembroich et al., 1997, Peypoux et al., 1999, Ongena et al., 2007, Cawoy et al., 2014). Il a été démontré récemment que les cLPS induisent le phénomène d'ISR sur divers pathosystèmes, grâce à l'utilisation de cLPs pures ou via l'utilisation de mutants possédant des motifs antigéniques modifiés. Très récemment Cawoy et al. (2014) ont fait une étude comparative sur une gamme des souches des *Bacillus* productrices de la surfactine en vue d'identifier le rôle de cette molécule dans l'induction de la résistance à la culture du tabac. Les résultats obtenus ont montré que le déclanchement des événements de défense de la plante par ces souches était fonction de la quantité de surfactine produite en tant qu'éliciteur. Il semble alors que cette molécule stimule les réactions immunitaires de la plante par activation de la voie oxilipine comme mécanisme de défense. (Jourdan et al., 2009). Elles peuvent aussi être utilisées en bio-remédiation pour la dépollution des sols (Korsaric, 2005, Mulligan, 2005). Par contre, elles n'ont pas intrinsèquement des propriétés antifongiques mais ont des effets synergiques sur l'activité antifongique de l'iturine A et de la Fengycine (Maget Dana et al., 1992, Leclère et al., 2006, Ongena et Jacques, 2008). Une autre activité intéressante sur le plan environnemental est leur faculté de dégrader les hydrocarbures (Kosaric, 2005).

La colonisation des racines par les *Bacillus* est un processus complexe dans lequel les lipopeptides peuvent intervenir à différents niveaux. L'attachement et l'agrégation des microcolonies sous forme de biofilms sont à l'origine de la colonisation des divers substrats (Ramey et al. 2004, Rivardo et al., 2013). Il existe des études qui ont montré le rôle des surfactines et non pas des fengycines ou des iturines dans la formation des pellicules dans l'interface eau-air (Peypoux et al., 1999, Kinsinger et al., 2003). Bais et ses collaborateurs ont

mis en évidence le rôle des surfactines dans la formation d'un biofilm stable, de la souche *B. subtilis* 6051 sur les racines d'*Arabidopsis*. Ils ont observé que la suppression de l'expression des surfactines dans cette souche diminue le taux de colonisation et le biocontrôle de la maladie causée par *Pseudomonas syringae* (Ahimou et al., 2000). Selon Bonmatin et al., (2003) et Peypoux (1999), l'activité spécifique des surfactines dans l'adhésion cellulaire et / ou la formation de biofilm pourrait s'expliquer par sa topologie 3D, qui renforce son caractère amphiphile par rapport aux autres familles de cLPS. Outre leurs activités antibactériennes et antivirales par les mécanismes les plus cités, les surfactines se sont également avérées être de bonnes inhibitrices de l'adhésion microbienne et de la formation de biofilm chez diverses bactéries pathogènes pour éviter qu'elles infectent l'hôte. Par exemple, les surfactines et les fengycines produites par *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* ont montré la capacité de contrôler *Escherichia coli* CFT073 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en l'empêchant de former les biofilms et d'adhérer à un substrat. Cette activité a été observée en revêtant la surface de polystyrène ou en ajoutant le bio-surfactant à l'inoculum (Rivardo et al., 2009, Zeraik and Nitschke, 2010, Mukherjee et Sen, 2009). Il a été aussi récemment démontré que les surfactines et les mycosubtilines fonctionnent comme des agents mouillants, en réduisant la tension de surface (Leclère et al, 2006, Hamley, 2015)

Les fengycines

Les membres de la famille des fengycines présentent une hétérogénéité à la 6^{ème} position dans la fraction peptidique ainsi que dans la longueur de la chaîne de l'acide gras β-hydroxy, qui varie de C-14 à C-17 atome de carbone (Kim et al., 2004). Les fengycines ont été classées en deux classes, à savoir la fengycine A et la fengycine B. La Fengycine A contient de l'Ala à la position 6 qui est remplacée par Val dans le cas de la fengycine B. La fengycine, est appelée plipastatine lorsque le Tyr3 et le Tyr9 est présent sous forme de L et D, respectivement. C'est un acyldécapeptide cyclique formant une structure lactonique constituée d'une chaîne d'acide gras 3-hydroxylée ayant 14 à 19 atomes de carbone liée à l'acide a-miné (L-Glu). La partie peptidique est constituée d'une chaîne décapeptidique, de 8 acides aminés (Tyr, Thr, Glu, Ala, Pro, Gln, Tyr et Ile) qui sont impliqués dans la formation d'un cycle peptidique par liaison lactone entre le côté du groupe phénolique-OH de la chaîne de Tyr3 et C-terminal-COOH groupe de Ile10 (Pathak et al., 2012).

Les fengycines sont des lipopeptides antifongiques à large spectre, elles sont particulièrement efficaces contre plusieurs espèces de champignons et agissent à des faibles concentrations. Ils

sont antagonistes contre les champignons pathogènes de plusieurs cultures et ont été suggérés pour l'agriculture (Ongena et Jacques, 2008). Les fengycines ont également une cytotoxicité limitée, nécessitant jusqu'à 40 fois la concentration des surfactines pour provoquer une hémolyse comparable dans les globules rouges humains (Meena et Kanwar, 2015). Le mode d'action complet des fengycines n'est pas connu, mais les études actuelles sur les interactions entre les fengycines avec les systèmes des modèles lipidiques suggèrent qu'ils fonctionnent à travers un mécanisme de perturbation et de la déstructuration membranaire (Deleu et al., 2008). Les plipastatines A1, A2 et B2 ont montré la faculté d'inhiber la phospholipase A2, qui catalyse l'hydrolyse des phospholipides, libérant de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est un précurseur des prostaglandines et des leucotriènes, qui sont des médiateurs pro-inflammatoires et conduisent au stress oxydatif et à la neuroinflammation si leur production n'est pas strictement réglementée. Ces lipopeptides pourraient donc être utiles dans le traitement de certaines maladies neurologiques. Récemment, on a montré que les fengycines diminuent la prolifération cellulaire dans diverses lignées de cellules cancéreuses, y compris la lignée cellulaire de cancer du poumon humain 95D *in vitro* et *in vivo* (cellules 95D xénogreffées chez des souris) (Yin et al., 2013).

Les iturines

La famille des iturines comprend la bacillomycine, l'iturine et la mycosubtiline, qui sont des lipoheptapeptides cycliques liés par un résidu β -aminoacide. L'iturine A, qui est le principal lipopeptide étudié de la famille des iturines, est un heptapeptide interconnecté avec un acide gras β -aminoacide ayant une longueur de C14 à C17 atome de carbone (Peypoux, 1978). Six autres membres de la famille des iturines ont ensuite été décrits : iturine C, la bacillomycine D, F, L et Lc et la mycosubtiline (Bonmatin et al., 2003). Les membres de cette famille ont une forte activité antibiotique, une activité surfactante modérée et une motilité de pulvérisation accrue (Korenblum et al., 2011, Sachdev et al., 2013). Arrebola et al., 2010 ont observé par microscopie optique que les iturines ont la faculté de provoquer le gonflement des spores et l'éclatement des spores chez certaines espèces de champignons mais aussi un déséquilibre osmotique au sein de ces dernières.

La classe des iturines ont principalement une activité antifongique, avec une activité antibactérienne limitée à *Micrococcus luteus* (Peypoux et al., 1979). Il existe des études qui montrent qu'elles exercent leur action fongicide en interagissant avec les composants

stéroïques dans la membrane fongique, ce qui conduit à une perméabilité accrue de K⁺ (Nasir et Besson, 2012, Maget-Dana et al., 1994). L'iturine A présente des propriétés antifongiques à large spectre, y compris une activité contre *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Pyricularia Spp.* (Seung Hyun et al., 2013). Les mixirines A, B et C, une autre forme d'iturines présentent des propriétés anticancéreuses, inhibant la croissance des cellules tumorales du côlon humain (HCT-116) avec des valeurs de CI₅₀ respectivement de 0,68, 1,6 et 1,3 µg/mL (Goutam Dey et al., 2015). La bacillomycine F inhibe également la croissance d'*Aspergillus flavus*, d'*Aspergillus niger*, de *Candida albicans*, de *Fusarium oxysporum* et de *Kluyveromyces bulgaris*. La bacillomycine F est également fortement antifongique et la bacillomycine Lc est active contre une variété de pathogènes fongiques des plantes. La mycosubtiline inhibe la croissance de plusieurs champignons et levures pathogènes réputés résistants comme *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* (Nasir et al., 2012) et le subtulène A présente à la fois des propriétés antifongiques et antibactériennes. Il existe également des études qui ont mis en évidence l'activité insecticides des iturines contre la mouche blanche des fruits et les larves des moustiques.

2.6. CONCLUSIONS

L'utilisation des pesticides sur toutes les cultures qu'elles soient vivrières ou de rente pour augmenter le rendement des cultures et assurer la sécurité alimentaire a toujours constitué un danger pour les agriculteurs, l'environnement et les consommateurs d'Afrique en général. Dans de nombreux pays en développement, particulièrement en République démocratique du Congo par exemple, les conditions ne permettent pas aux petits agriculteurs d'utiliser sans danger les pesticides chimiques. «Il en résulte des dégâts permanents tant pour la santé des agriculteurs que pour l'environnement», déclarait Jacques Diouf, directeur général de la FAO, au moment de l'entrée en vigueur de la Convention de Rotterdam en 2004.

Les pesticides sont utilisés sans discernement par les agriculteurs qui, souvent, ne savent pas lire les étiquettes, ni respecter les doses et l'usage selon la maladie ou le ravageur spécifique à combattre. Les conditions de stockage sont inadéquates et la distribution des pesticides dans les contenants qui sont ensuite réutilisés à des fins alimentaires provoquent également parfois des accidents graves voire mortels au sein des populations les plus vulnérables, en particulier les femmes et les enfants, celles-ci étant aussi les plus impliquées dans l'intensification de

l'agriculture. De nombreuses pratiques observées dans l'utilisation et la manipulation des produits chimiques toxiques (manque de systèmes de protection, non-respect des doses et de la période d'attente, pesticides périmés) exposent l'agriculteur, sa famille, les consommateurs ainsi que les populations aux risques d'intoxication directe ou chronique et engendrent également des problèmes de pollution environnementale.

En l'absence d'un système de toxicovigilance des pesticides et d'une réglementation adéquate, la défaillance par manque de moyens financiers des services de l'État de la plupart des pays d'Afrique tropicale subsaharienne censés assurer le bon usage des pesticides et la formation de la plupart des agents qui ne se limite souvent qu'à la collecte des taxes favorisent également l'entrée dans le pays des pesticides prohibés, dont certains ont été retirés du marché dans d'autres pays à cause de leur toxicité.

Bien que le niveau d'utilisation des pesticides dans l'agriculture en Afrique soit encore faible, celle-ci est en progression rapide pour certaines cultures, comme les cultures industrielles d'exportation, les céréales tels le riz et le maïs, les cultures maraîchères et en agriculture périurbaine. Il est donc important de prendre des dispositions pour éviter une évolution vers une forte dépendance vis-à-vis des pesticides chimiques qui entraîneraient à long terme des problèmes sur la productivité du secteur agricole et de l'environnement. Dans ce contexte, le choix méthodes alternatives comme la lutte biologique avec l'utilisation des biopesticides microbiens serait une des solutions.

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes du genre *Bacillus spp.* est une alternative très prometteuse en vue d'assurer une protection phytosanitaire performante des plantes de par leur ubiquité naturelle dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur diversité de spécificité d'action et aussi leur faible persistance dans l'environnement.. Dès lors, de nombreux produits biologiques microbiens ont été homologués au cours de cette décennie en Afrique tropicale avec comme référence le Kenya et l'Afrique du Sud pour faire face aux problèmes posés par les pathogènes des plantes et répondre aux exigences du marché Européen. Parmi eux, les genres *Bacillus*, particulièrement *B. thuringiensis* sont les plus commercialisés et font aujourd'hui l'objet d'une production industrielle par certaines sociétés dans ces pays, mais l'offre reste encore faible par rapport à la demande suite au manque des infrastructures de production dans plusieurs pays et le faible niveau de technologies. Les *Bacillus* présentent l'avantage de stimuler la croissance des plantes, mais aussi de contrôler les pathogènes de ces dernières grâce à plusieurs mécanismes, dont l'antibiose, grâce à leur capacité, d'une part, à produire divers métabolites, composés volatils et enzymes impliqués dans l'activité antifongique, antivirale et antibactérienne, et, d'autre part, à induire la résistance systémique

chez ces plantes pour qu'elles puissent se défendre contre toute attaque ultérieure. Utilisés dans une stratégie de lutte intégrée en combinaison avec les pesticides chimiques, ils permettent de limiter la quantité d'intrants ainsi que l'apparition de nuisibles résistants.

OBJECTIFS ET STRATEGIES

OBJECTIFS ET STRATEGIES

Sur le plan appliqué, les travaux de cette thèse se placent dans le contexte du développement de produits biologiques à base de microorganismes utilisables comme biopesticides. Ces produits sont très prometteurs car ils offrent une alternative aux produits chimiques. Ils sont écologiquement compatibles et non dangereux pour la santé de l'agriculteur, des consommateurs et l'environnement. Ces biopesticides microbiens peuvent également dans certains cas offrir une solution phytosanitaire dans le contexte de la lutte contre certaines maladies des cultures pour lesquelles il n'y a pas de produits chimiques disponibles, soit si ces derniers sont utilisés abusivement ou trop couteux pour que l'agriculteur puisse s'en fournir comme c'est le cas dans le milieu tropical d'Afrique subsaharien en général et particulièrement au Sud-Kivu en République démocratique du Congo. Dans ce contexte, nos travaux ont ciblé la problématique des ravages causés par des champignons phytopathogènes sur le maïs entant que principale céréale consommée en RD Congo. Dans la première phase nous avons isolé et caractérisé plusieurs souches fongiques responsables d'effets délétères sur les épis en champs ou stockés après récolte, et ce dans deux zones agro-écologiques du Sud –Kivu bien distinctes, caractérisées par des conditions climatiques et pédo-environnementales différentes sur base de caractère morphologique, pathogénicité et moléculaire par homologie des séquences ITS.

Ensuite nous avons réalisé une série des tests en laboratoire visant à évaluer le potentiel de diverses souches bactériennes de l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens* issues de notre collection à inhiber *in vitro* le développement de ces pathogènes fongiques et leur effet protecteur sur les plants de maïs en relation avec leur production des lipopeptides antifongiques (surfactines, iturines et les fengycines). Beaucoup de ces souches montraient un effet positif, mais les résultats ont permis de sélectionner une souche de *B. amyloliquefaciens* S499 particulièrement efficace. Sur base de ces résultats, dans la deuxième phase, nous avons organisé d'expériences au champ dans les deux zones concernées visant à déterminer le réel potentiel de S499 à protéger le maïs dans les conditions agricoles dans l'objectif de mettre en lumière le réel potentiel de ce microorganisme non seulement pour protéger les cultures contre les infections fongiques mais aussi en terme de promotion de croissance des plantes et de rendement en épis

La recherche sur *Bacillus* en tant qu'agent de lutte biologique a principalement porté sur l'efficacité et les facteurs influençant la production des lipopeptides dans la rhizosphère ont fait également objet de plusieurs études au sein de notre laboratoire (Deboiset al., 2014, Nihorimbere et al., 2009, Nihorimbere et al. 2012). Cependant, on connaît encore peu de choses

sur la communication chimique entre un pathogène et une bactérie entant qu'agent de lutte biologique dans l'interaction rhizobactérie-plante-pathogène. C'est ainsi que dans une troisième partie et à un niveau plus fondamental, notre objectif visait à comprendre si la bactérie est en mesure de percevoir le signal moléculaire émis par un pathogène et moduler la production de certains antibiotiques de nature lipopeptidique et les gènes responsables de leur biosynthèse. L'objectif principal de notre thèse est donc de contribuer à combler cette lacune de connaissance. Notre stratégie de recherche consistait à étudier davantage l'activité antagoniste en faisant en sorte que les deux partenaires interagissent et identifier la famille de CLPs impliquée spécifiquement dans l'inhibition du pathogène et évaluer si sa production peut être modulée par l'interaction tripartite rhizobactérie-plante-pathogène entre les deux microbes sur exsudats de maïs pris comme contexte nutritionnel plus représentatif des conditions naturelles de la rhizosphère. Enfin, nous avons fait un criblage des plusieurs souches sur base de leur efficacité corrélée avec la production de lipopeptides dans l'objectif d'élargir le nombre des souches de *Bacillus* susceptibles d'être exploitées comme bio pesticides en Afrique centrale.

RESULTS

CHAPTER 3. CHARACTERIZATION OF FOUR ENDEMIC FUNGAL PATHOGENS ISOLATED FROM DISEASED MAIZE PLANTS

3.1. INTRODUCTION

Maize is the most widely grown cereal crop in the world (990.64 million tonnes per year according to the USDA WASDE (report, May 2015), appreciated for its nutritional properties as food and feed, and is also a resource for many industrial uses. Unfortunately, corn is a host crop for many pathogenic species that transmit serious diseases to ears, foliage, roots and stems and foliage, which negatively affects the yield and quality of harvest. Diseases inflicted by natural pathogens on this important crop are harmful to the economy and threaten food supplies worldwide, especially in areas where maize is a staple commodity such as in tropical climate. There are several diseases on maize in this region, favored by the hot and humid climate, some of which are endemic and some of which are still known. The detection and identification of the pathogens responsible for the observed symptoms is an essential element in the control of plant diseases. It is in this context that we first identified and characterized the pathogens isolated on maize in South Kivu before testing the efficacy of the various *Bacillus spp.* for the biological control of these diseases.

3.2. MATERIALS AND METHOD

3.2.1 Fungal species identification and culture condition

The fungal pathogen was isolated from infected seeds and ears of maize collected in South Kivu (DR Congo, the province extends between 1 ° 44'13 " and 4 ° 51'32 " east longitude and between 26 ° 10'30 " and 29 ° 14'10 south longitude). This infected plant material was placed on PDA (potato dextrose agar supplemented with chloramphenicol) plates during 18 days at 25°C. For further purification, the fungus was subcultured five times (every two weeks) on the same medium using spores as inoculum. The fungus was then maintained at 25 °C by sub-culturing every 2 weeks on PDA medium. Fungal species identification was first based on morphology and microscopy observation (5 replicates, independent cultures on PDA plates) and further identified by the laboratory of mycology at the Catholic University of Louvain-La-Neuve in

Belgium. It was performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) gene. Fungal DNA was extracted using EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit (Bio Basic, Ontario, Canada). Amplification of ITS genes using universal primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) /ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) as well as sequencing was achieved by Macrogen- Europe and DNA sequences were compared against NCBI database using BLAST alignment (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.2. Pathogenicity assays

In order to check whether these fungi were responsible for the symptoms observed on seeds and ears of corn in the South Kivu region, pathogenicity assays were realized to evaluate the ability of fungi to infect maize seeds (local variety "Bambou") and seedlings. Fungi were grown on PDA plates for 18 days at 25 °C. The mycelium was collected, placed in peptone water and mixed to recover the spores. Maize seeds were dipped in a solution of 10^8 spores/ml for one hour, placed on moistened Wathman paper to facilitate germination and incubated at 25°C. Four seeds were then placed in Petri dish containing moistened Wathman paper for germination. The assessment of pathogenicity on seedling was evaluated by the incidence of diseases on seed rot, root decay or reduction in both the number and mass of roots after 25 days.

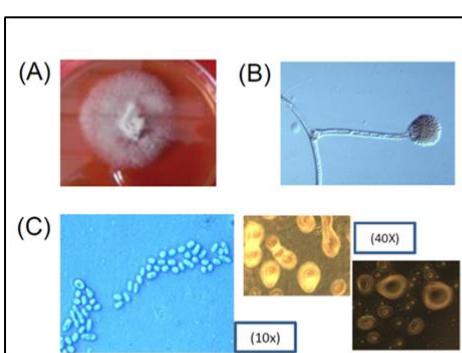
3.3. RESULTS

3.3.1. Taxonomic identification based on morphological and genetic traits

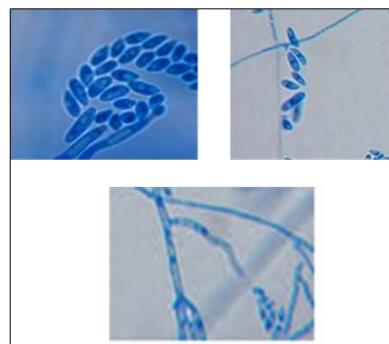
Four phytopathogenic fungal strains in this study were isolated from diseased seeds of maize cobs collected in two specific agro-ecological zones of South-Kivu. These fungal isolates were suspected by local farmers as responsible for important diseases causing serious losses in maize yields, even if no detailed data are available. They were identified in this work as *Fusarium verticillioides*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium variabile* according to both morphological traits and sequence homology of the ITS genes. *Fusarium verticillioides* is characterized by mycelium typically harboring a pink color upon growth on PDA. Conidiophores are not branched and produce conidia assembled in fine and long chains. The microconidia (4-14 x 1.5-2.5 μm) are arranged in chains and are hyaline, fusiform, unicellular and occasionally two-

celled. The macroconidia (27-74 x 2.5-7,8 μm) are straight or slightly curved and provided with 3 to 7 partitions. For *Rhizospus stolonifer*, the fungal colonies were white cottony at first, and became heavily pickled with the appearance of sporangia and the brownish black, spreading rapidly by means of stolons fired at various points to the substrate by rhizoids. Sporangia were 82.7×195.7 mm long and were globose or sub-globose with somewhat flattened base. The color of sporangia was white at first and then turned black with many spores and contained thousands of spherical sporangiospores. Sporangiophores were 2.85.8×12.3 mm wide, smooth-walled, non-septate, light brown, simple, long, and arising in groups of 3,5 mm from stolons opposite rhizoids. Sporangiospores were 8.2-18.8 mm in diameter, irregular, round, oval, elongate, angular, and brownish-black streaked. Rhizoids and stolons were hyaline to dark brown. Concerning *Penicillium variabile Sopp*, colonies are velvety greenish black with a mass of white mycelium at the center. The penicilles are asymmetrical and often complex, with different ramifications. Conidiophores are smooth and measure 3-4 microns. Their metulae measure 3-5 8-12 x 2-4 μm . Phialides are grouped by 4-7, they are ampulliformes and measure 7-10 x 2 μm . Conidia are globose to sub-elliptical, smooth and arranged in long irregular channels. They measure 2-4 x 2-3.5 μm . For *Rhizomucor variabilis*, phenotypical characterization of this fungal phytopathogen grown on PDA plate showed a typical cotton candy like texture. At early stage of growth, fungal colonies appeared white before turning grayish to grey after few days of culture. Microscopic observation (Figure 3.1) shows hyaline, broad, non-septate and branched hyphae. Erected unbranched sporangiophores (up to 12.7 to 16.2 μm wide), which appeared sparingly branched later, was also observable. In addition, sporangia appear globose, yellowish, and up to 70 to 75 μm in diameter sporangia with ellipsoidal to spherical columellae. Sporangiospores were ellipsoidal and often flattened on one side, measuring 7 to 9 μm x 2 to 4 μm . Sequencing of Internal Transcribed Spacer (ITS) of the fungal pathogen revealed 100 % identity with *Rhizomucor variabilis* type strain CBS 103.93.

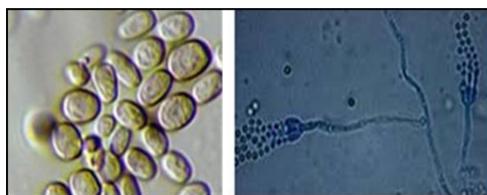
(1) *R. variabilis*



(2) *F. verticillloides*



(3) *P. variabile*



(4) *R. stolonifer*



Figure 3.1: Characterization of the fungal phytopathogens isolated in this work. Typical morphology observed for mycelium growing on PDA.

3.3.2. Effect of pathogens on seeds and seedlings

The pathogenicity of the four fungi was counter-checked on maize seedlings and all caused important damages, albeit to different extends, in terms of inhibition of germination, seed rotting as well as in the number/weight of roots (Table 3.1). The inhibition of germination was higher upon infection by *P. variabile* but the three pathogens caused severe root damages. In terms of biomass and growth of seedlings, *F. verticillloides* caused the same adverse effects than other. *Penicillium* symptoms were characterized by discoloration and rot of roots and mesocotyl. Sometimes a blue-green fungal growth can be seen on infected seeds, yellowing of the tips of the leaves, stunted growth and plant death. Plants infected with *Fusarium* had reddish or pink lesion on the roots and mesocotyl. When the attack is strong progressive wilting of the

plant is observed until his death. Root symptoms range from very slight brown discoloration to dark black, completely rotted roots.

Table 3.1. *In vitro* pathogenicity of fungal isolates on maize seedlings. Seeds were immersed in a spore suspension (water for controls) for 10 min, placed on moistened Whatmann paper in Petri dishes and incubated at 25°C for 20 days. Values represent means and standard deviations calculated from four repeats in two independent experiments (n=8).

Fungal species	Number of roots	Root biomass (g)	Germination (%)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	3.5 ± 1.9	0.59 ± 0.12	47,5 ± 15
<i>Penicillium variable</i>	4.4 ± 1.2	0.66 ± 0.13	65 ± 23
<i>Rhizomucor variabilis</i>	4.6± 1.1	0.60± 1.18	68± 13
<i>Fusarium verticillioides</i>	3.6 ±1.8	0.60 ± 0.11	55 ± 34
Control	13 ± 5	0.82 ± 0.16	100

3.4. CONCLUSIONS

The aim of this study was to identify and characterize the fungal strains associated with symptoms observed in corn seeds and corn in the South Kivu region of eastern Democratic Republic of Congo. The isolates were made from samples of diseased cobs and seeds. An evaluation of the pathogenicity of strains on corn seeds up to their germination under controlled conditions was carried out in order to establish definitively, according to the Koch postulate that this strains isolated were indeed the strains involved in the symptoms observed on seeds and young seedlings of corn in the South Kivu region and to assess their level of pathogenicity. This study confirmed that all strains exhibited pathogenicity to seeds and young seedlings with degrees of virulence slightly different. The *Penicillium variable* strain has a higher impact than others and can be considered the most virulent, while *R. variabilis* strain can be considered the least virulent.

CHAPTER 4. LIPOPEPTIDES PLAY A MAJOR ROLE IN THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS* *IN VITRO*

4.1. INTRODUCTION

Biological control involving natural antagonistic microorganisms has emerged as a promising alternative to reduce the use of chemical pesticides in agriculture. Some plant-associated isolates of the *Bacillus amyloliquefaciens* species are particularly efficient biocontrol agents to fight a wide range of plant diseases (Cawoy et al., 2011; Pérez-García et al., 2011). The main mechanisms by which this rhizobacterium provides its protective effect to the plant include the induction of natural defenses in the host via the release of so-called elicitor molecules (Induced Systemic Resistance) (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Berendsen et al., 2012); the competition with pathogens for space and nutrients in the same ecological niche; the production of various low-molecular weight antimicrobials, extracellular enzymes or volatile compounds (VOCs) that can play a short- or long-distance role in direct antagonism of pathogens (Yuan et al., 2012; Ashwini and Srividya, 2013). The biocontrol activity of *B. amyloliquefaciens* thus largely relies on its potential to secrete a range of multifunctional secondary metabolites including cyclic lipopeptides (CLPs). CLPs are synthesized in an mRNA-independent way by modular enzymes (non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs, or hybrid polyketide synthases/non-ribosomal peptide synthetases, PKSs-NRPSs; Fischbach and Walsh, 2006; Walsh, 2014). This leads to a remarkable structural heterogeneity varying from one family to another in the type, number and sequence of amino acid residues as well as in the nature of the peptide cyclization. Within each family, some differences occur in the nature, length and branching of the fatty acid chain leading to the co-production of various homologues by a single strain (Ongena & Jacques, 2008). The three main CLPs families are surfactins, iturins and fengycins. Surfactins are heptapeptides linked to a fatty acid (length C12-C16) via a cyclic lactone ring structure. Iturins are also heptapeptides bound to a β -amino fatty acid chain, with a length varying from C14 to C17. The iturin group comprises several variants including bacillomycins and mycosubtilins. Fengycins also called plipastatins are lipodecapeptides with an internal lactone ring in the peptidic moiety (Ongena & Jacques, 2008). CLPs globally play important roles in the tritrophic interactions between the *Bacillus* producing strains, the plant and the pathogens (Raaijmakers et al., 2010). Surfactins are powerful biosurfactants, with

antiviral activities but low antibacterial or antifungal activities (Peypoux et al., 1999; Tendulkar et al., 2007, Abdallah et al., 2015) while iturins and fengycins mostly display antimicrobial activity against a range of yeasts and filamentous fungi (Thimon et al., 1995; Ongena & Jacques, 2008; Zeriouh et al., 2011). CLPs have also been described for their involvement in root colonization as well as in the systemic stimulation of the host plant immune system leading to ISR. These compounds are thus crucial both for rhizosphere fitness of the producing strains and for their biocontrol potential (Ongena et al., 2005; Romero et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2010; Cawoy et al., 2015; Borriis, 2011; Chowdhury et al., 2015). Our understanding of the cellular regulatory processes driving CLPs synthesis in *Bacillus* and other bacterial species like *Pseudomonas* has improved thanks to major advances in comparative genomics and transcriptomics (Raaijmakers et al., 2010). However, very little is still known about the possible impacts of interspecies or interkingdom interactions occurring in the rhizosphere on the production of key biocontrol metabolites such as CLPs. In this paper, we wanted to get a closer look at the relative role of each LP family in the overall antifungal activity of *B. subtilis / amyloliquefaciens* on maize pathogens. To this end, a comparative study was conducted involving multiple strains that were tested against four different isolated on seeds and cobs of maize. We have combined various approaches to further illustrate that the secretion of these LPs is a crucial element in the direct elimination of pathogens using the root exudate, PDA medium and LB medium commonly used for CLPs production. These strains were then confronted with the phytopathogens and the correlation between the amplitude of antagonism and the amounts of LPs accumulated in the zone of inhibition gave first indications on the relative importance of each family for the inhibition of pathogens. These data were then supported by results from more targeted approaches such as testing of selected mutants to determine the family of CLPs specifically implicated in pathogen inhibition.

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1. *Bacterial strains culture conditions*

The bacterial strains used in this study are listed in Table 4.1. These isolates were selected based on their known capacity to protect plants against fungal phytopathogens correlated with the production of the three main lipopeptides families (surfactins, iturins and fengycins, Table 1).

They were routinely cultivated on 868 medium plates (yeast extract 16 g/l, casein peptone 10 g, glucose 20 g/l, agar 17g/l) at 26°C and maintained at 4°C before use. The maize variety used for experiments was Eckavel currently broadcast in Kivu by the Haves Plus program of CGIAR-IITA. Seeds displayed an average 90% germination rate under standard conditions. They were stored in aluminum bags at 4°C, relative humidity (RH) 50%.

Table 4.1. Bacterial strains used in this study and their abilities to produce the three different CLP families.

Strain	Source, Reference	Lipopeptide production		
		Surfactin	Iturin	Fengycin
<i>B. amyloliquefaciens</i> S499	LabStock, (Nihorimbere et al., 2012)	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	R. Borriß, Humboldt University, Berlin. Germany (Chen et al., 2006)	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> GA1	Lab Stock, (Arguelles Arias et al., 2009)	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> QST713	J. Margolis, Agraquest, USA.	+	+	+
<i>P. polymyxa</i> PP56	B. McSpadden Gardener, Ohio State University, USA.(Cawoy et al., 2015)	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 98S	B. McSpadden Gardener, Ohio State University, USA.(Cawoy et al., 2015)	+	+	+
<i>B. subtilis</i> 2504	Lab stock (Ongena et al., 2007)	-	-	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CH1	R. Borriß, Humboldt University, Berlin. Germany; (Koumoutsi et al., 2004)	-	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CH2	R. Borriß, Humboldt University, Berlin. Germany; (Chen et al., 2006)	-	+	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> AK3	R. Borriß, Humboldt University, Berlin. Germany; (Koumoutsi et al., 2004)	+	-	-
<i>B. subtilis</i> BN01	Lab Stock,(Cawoy et al., 2015)	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 168	Lab Stock, (Cawoy et al., 2015)	-	-	-

4.2.2. First antagonism assays for in vitro screening of protective *Bacillus* strains

To conduct the experiments, a small section of mycelium (3 cm) of an eight-day old fungal preculture grown on PDA medium was taken and placed either on PDA or agar-gelified maize exudate medium plates. Afterward, 2 days-old colonies of *Bacillus* pre-grown on 868 medium

(yeast extract 16 g/l, casein peptone 10 g, glucose 20 g/l, agar 17g/l) were collected using a sterile toothpick and deposited on opposite edges of the Petri dish (approximately 3 cm from the piece of mycelium). Antagonistic activity was evaluated by measuring the distance (in mm) between the fungus and the bacterial colony after 3 days growth at 25°C.

4.2.3. Lipopeptides extraction and analysis by UPLC-MS

In order to extract lipopeptides from agar, a liquid-solid extraction from 1-cm diameter agar plugs was performed. Briefly, agar samples from the inhibition zone were mixed with 500 µL of 50% acetonitrile homogenized by vortexing and incubated at 4°C for four hours. They were subsequently centrifuged (10,000 rpm for 10 min) and the supernatant was filtered through 0.22 µm filters. For the estimation of the concentration in these extract, the obtained filtrates were analyzed using UPLC-MS with UPLC (Acquity H-class, Waters s.a., Zellik, Belgium), coupled to a single quadrupole mass spectrometer (SQD mass analyzer, Waters,) using an C18 column (Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 50 mm, 1.7 µm). Ten µl was injected and elution was performed with a constant flow rate of 0.6 ml min⁻¹, using water/acetonitrile acidified with 0.1% formic acid gradient. Compounds were identified/quantified based on their retention times and masses were compared to commercial standards (98% purity, Lipofabrik Society, Villeneuve d'Asc, France), as described by Debois et al. (2014).

4.2.4. In vitro evaluation of antifungal activity of semi-purified lipopeptides

The objective of this phase was to correlate the efficacy of the strains with the production of the antifungal compounds and the pathogens' inhibition on seeds, as well as to assess the quality of the exudates as the only source of nutrients for bacteria and therefore to grow, multiply on the seeds and consequently to colonize the roots. This would allow them to take advantage of the nutrients furnished by the roots and in part to produce the molecules necessary for the survival of the plants (fungitoxic molecules such as iturins and fengycines, growth hormones, and elicitor triggers of the immune and antiadhesive systems from pathogens to plant roots, such as surfactin). In order to do so, the corn seeds were first sterilized in sodium hypochlorite and washed extensively with distilled water, after which they were soaked in sterile distilled water for 72 hours and incubated at 20 and 29°C. After the exudates recovered, they were

filtered on the Millipore of 0.45 to serve as a bacterial culture medium for 48 hours at the two temperatures of 20°C and 29°C. The supernatant was recovered and, before extraction, the lipopeptides that were contained in the supernatant were concentrated at speed vac for 18 hours, while their extraction was made with methanol and their analysis by LC-MS, following the method described by Arguelles-Arias et al. (2009).

After the extraction and semi-purification of the lipopeptides that were produced by the best bacteria strain on seeds, we evaluated their antifungal activity. The evaluation of the antifungal activity of the lipopeptides was carried out in 96-well microplates containing 150 µL of PDB medium (Potato Dextrose Broth), which were inoculated with 30 µL of fungal spore suspension (108 spores/mL), supplemented with different concentrations of compounds (from 0 to 40 µg/mL). Plates were subsequently incubated at 25°C for 48 hours and the inhibition of pathogen growth was determined by measuring the absorbance at 620nm (OD 620 nm), using a microplate reader (Beckman). Each experiment was repeated three times.

4.2.5. Confrontation assays assays on natural maize root and seed exudates (MRE medium)

All experiments were performed by using media that reflect the real nutritional status of bacteria evolving in the rhizosphere, both qualitatively and quantitatively. In this environment, available nutrients are almost exclusively provided by seeds and root exudates with specific compositions in organic acids, sugars or amino acids. In order to conduct the experiments, a small section of mycelium (3 cm) of an eight-day old fungal culture grown on PDA medium was taken and placed on agar-supplemented with maize roots or seed exudates medium plates (15g/ 1 MRE). Subsequently, two-day old colonies of *Bacillus* grown on 868 medium (yeast extract 16 g/l, casein peptone 10 g, glucose 20 g/l, agar 17g/l) were collected using a sterile toothpick and deposited on opposite edges of the Petri dish (approximately 3 cm from the piece of mycelium). Antagonistic activity was evaluated by measuring the distance (in mm) between the fungus and the bacterial colony after three days of growth at 25°C. In order to extract lipopeptides from agar, a liquid-solid extraction from 1-cm diameter agar plugs was collected in the inhibition zone. Briefly, agar samples were mixed with 500 µL of 50% acetonitrile, homogenized by vortexing and incubated at 4°C for four hours. They were subsequently centrifuged (10,000 rpm for 10 min) and the supernatant was filtered through 0.22 µm filters. In order to estimate

the concentration in these extracts, the obtained filtrates were analyzed using UPLC-MS, following the method described by Debois et al., 2014.

4.2.6. Determination of lipopeptide production upon growth in root exudates and artificial media

Sterilized seeds were placed in Petri dishes (5 seeds per plate) containing moistened Wathman paper and incubated for 14 days in the dark at 22°C. Maize root exudates (MRE) were collected from these seedlings with 5 ml of sterile distilled water for each plate. The solution was used as such after filtration through 0.22µm. The tomato exudate mimicking (EM) medium was adapted from Nihorimbere et al. (2012) and contained per liter : (NH₄)₂SO₄ 1 g, CuSO₄ 1.6 mg, Fe₂(SO₄)₃ 1.2 mg, KCl 0.5 g, KH₂PO₄ 0.7 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, MnSO₄ 0.4 mg, MOPS 21 g, Na₂MoO₄·2H₂O 4 mg, casamino acids 0.5 g, citrate 2 g, fructose 1.7 g, fumarate 0.5 g, glucose 1 g, malate 0.5 g, maltose 0.2 g, oxalate 2 g, ribose 0.3 g, succinate 1.5 g, yeast extract 1 g, pH 6.5. The LB medium contained tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7. Cultures were performed in 24-well plates by inoculating 2 ml of fresh medium (LB, MRE or EM) with 25 µl of a bacterial cell suspension ($OD_{600} = 0.1$) corresponding to 1×10^7 CFU/ml. Plates were incubated with continuous shaking for 40 h at 28°C. The supernatants obtained after centrifugation were filtered through a 0.2 µm membrane (Sartorius AG), after pooling the content of three wells (repetitions) for each strain.

4.2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with Excel and Statistix 8.0 software. Data from biocontrol assays *in vitro* and in growth chambers were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and significant differences between the various treatments were detected using (LSD) (least significant difference of means test) at α 0.05.

4.3. RESULTS

4.3.1. Antagonistic activity of various bacilli in confrontation tests

Four strains of *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 (Arguelles-Arias et al. 2009), QST713 (commercial product, Bayer Crop Science), 98S (Cawoy et al. 2014), S499 (Cawoy et al. 2014) and one of *Paenibacillus polymyxa* isolate PP56 (Debois et al. 2013, Cawoy et al. 2015) were selected based on their high potential to produce antimicrobials and on their previously reported biocontrol activity. The antagonism potential of those bacteria against the four pathogens was first evaluated on gelified PDA medium via classical direct confrontation tests. Data expressed as diameter of inhibition zones are presented in Fig. 4.1 showing that all strains tested inhibited the growth of the three fungal pathogens albeit not with the same efficacy. QST713 and S499 appeared as the best antagonists against most pathogens while *P. polymyxa* PP56 displayed significant inhibition only against slow-growing pathogens such as *P. variabile*.

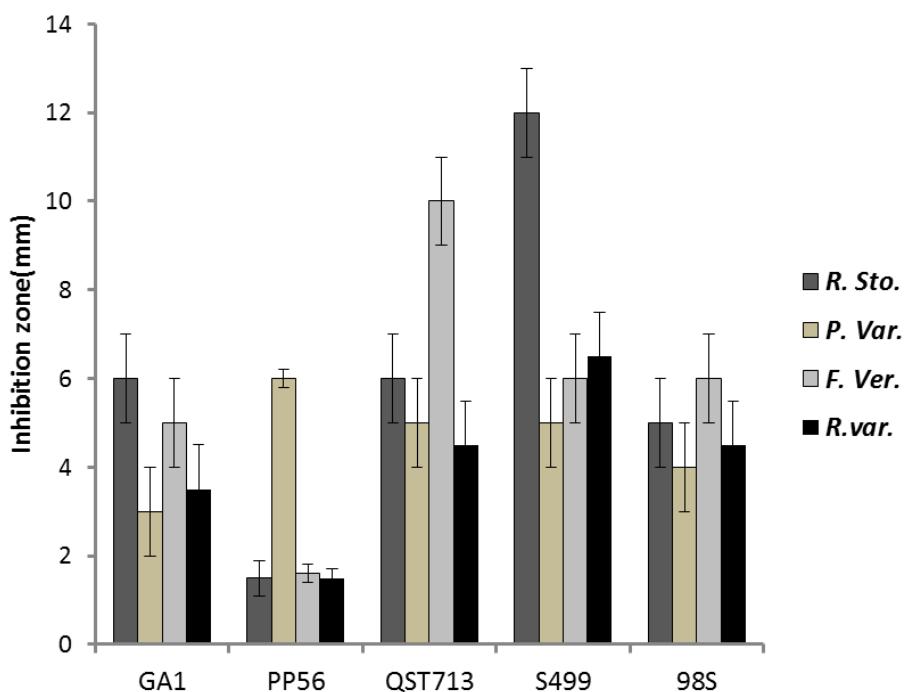


Fig.4.1. *In vitro* primary screening for antagonistic activities against phytopathogens. Inhibition of mycelium growth of the four fungal pathogens (*F. ver.*, *Fusarium verticillioides*, *R. Sto.*, *Rhizopus stolonifer* and *P. Var.*, *Penicillium variabile* and *R.var.*; *Rhyzomucor variabilis*) by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (strains GA1, QST713, 98S, S499) and *Paenibacillus polymyxa* (PP56) as observed in confrontation tests on PDA medium upon incubation at 25°C for 5 days. Means were calculated from four replicates and two independent experiments (n=8). Error bars represent the standard deviation of the mean at p < 0.05.

In natural conditions, plant-associated bacteria feed exclusively on root exudates to ensure growth/survival and consequently to form secondary metabolites involved in biocontrol. Additional experiments were carried out to determine whether the bacteria had the capacity to grow on the exudates of corn and to exert an antagonistic activity on an exudate-based gelified medium. The five strains were thus tested for antifungal activity on a gelified mineral medium supplemented with maize exudates (collected from the same seedlings grown gnotobiotically) as unique carbon and nitrogen sources. Interestingly, a similar trend was observed with all bacterial isolates exhibiting some antagonistic activity but strain S499 followed by QST713 appeared to be those exhibiting significant antagonistic activity on all pathogens although this antagonistic activity was variable according to the pathogen (Fig. 4.2.).

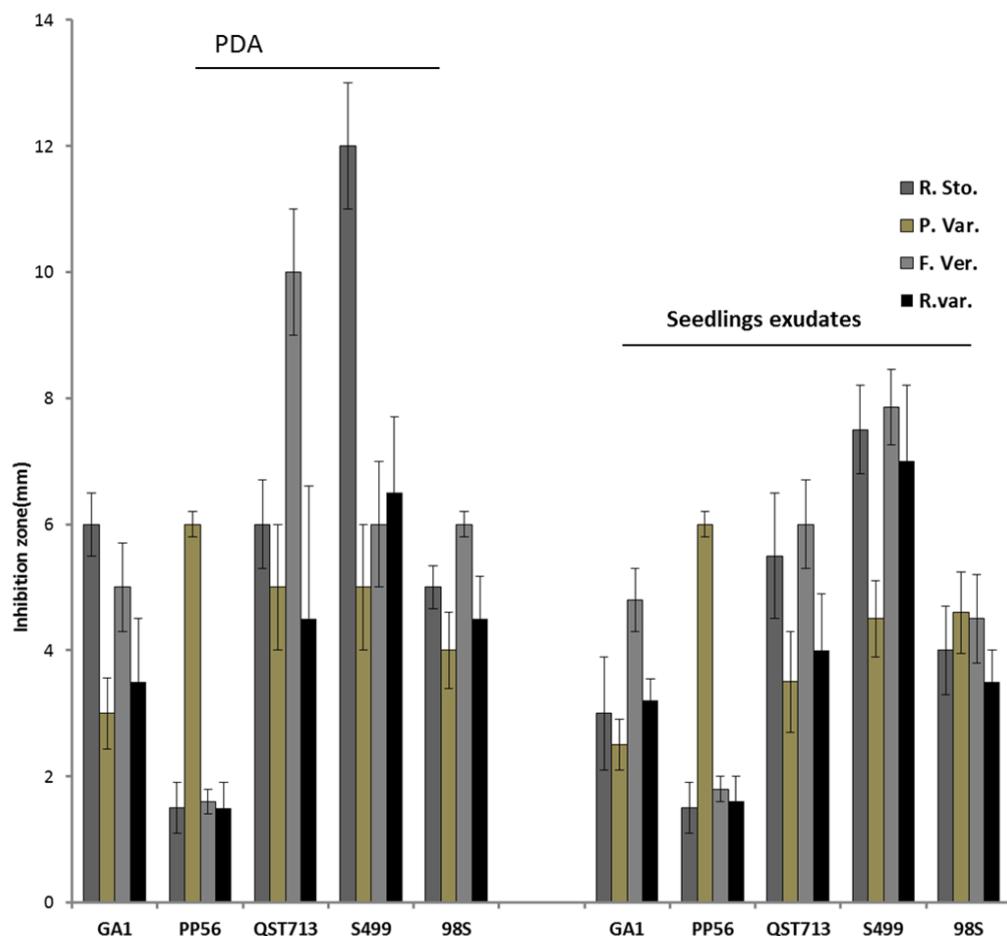


Fig.4.2. Inhibition of mycelium growth of the three fungal pathogens (*F. ver.*, *Fusarium verticillioides*, *R. Sto.*, *Rhizopus stolonifer* and *P. Var.*, *Penicillium variabile*) by *Bacillus* strains *--compared on PDA and on gelified maize seedling exudates upon incubation at 25°C for 5 days. Means were calculated from four replicates and two independent experiments (n=8). Error bars represent the standard deviation of the mean at $p < 0.05$.

4.3.2. Root colonization and *in planta* lipopeptide production on perlite-grown maize plantlets in comparison with artificiel media

Experiments were performed on 20 days-old maize plants elevated under gnotobiotic conditions (sterilized perlite as growth substrate) in order to evaluate S499 colonization and possible antibiotic production *in planta*. Data revealed that the bacterium efficiently colonized maize roots to reach populations of $1.1 \pm 0.2 \times 10^8$ CFU/g of root (mean and s.d. calculated from 5 plants) and produced surfactins in relevant amounts (2.3 ± 0.4 µg/ml of rhizosphere) as well as some fengycins and iturins but in non-measurable amounts. We used a second approach to appreciate the ability of the *B. amyloliquefaciens* isolate to possibly form secondary metabolites such as lipopeptides under a more realistic nutritional context according to the rhizosphere ecology by growing S499 in exudates collected from maize seedling elevated under gnotobiotic conditions as sole nutritional source (MRE) medium. These naturally produced maize exudates represented an adequate food source as they sustained growth of the S499 strain to an OD₆₀₀ value of approx. 0.8. Lipopeptides of the three different families *i.e.* surfactins, fengycins and iturins were also readily formed in these conditions as detailed in Figure 4.3 showing the whole range of typical ions detected by UPLC-MS analysis of the culture supernatant (Debois et al., 2014).

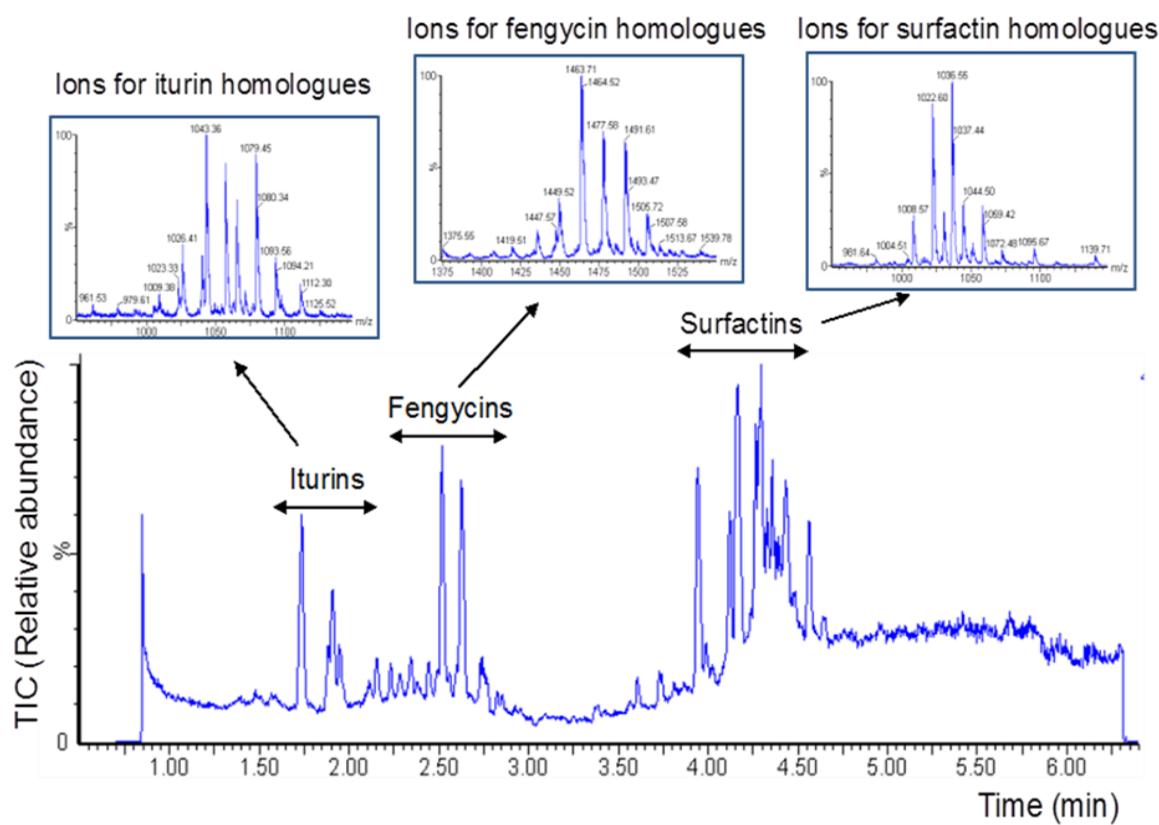


Figure 4.3.: Diversity of lipopeptides secreted by strain S499 upon growth in maize exudates. UPLC-ESI-MS chromatogram illustrates the variety of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 upon growth in exudates collected from maize seedling as sole nutritional source (MRE medium). Extracted ions typical for surfactins, iturins and fengycins and representing the various homologues within each lipopeptide family are detailed in boxes.

Interestingly, these data also revealed high relative amounts of fengycins compared to the blend of lipopeptides released by S499 after growth in other media such as the artificial LB medium or in the exudate mimicking (EM) medium containing C and N sources reflecting root-exuded products from other plant species such as tomato (Figure 4.4.).

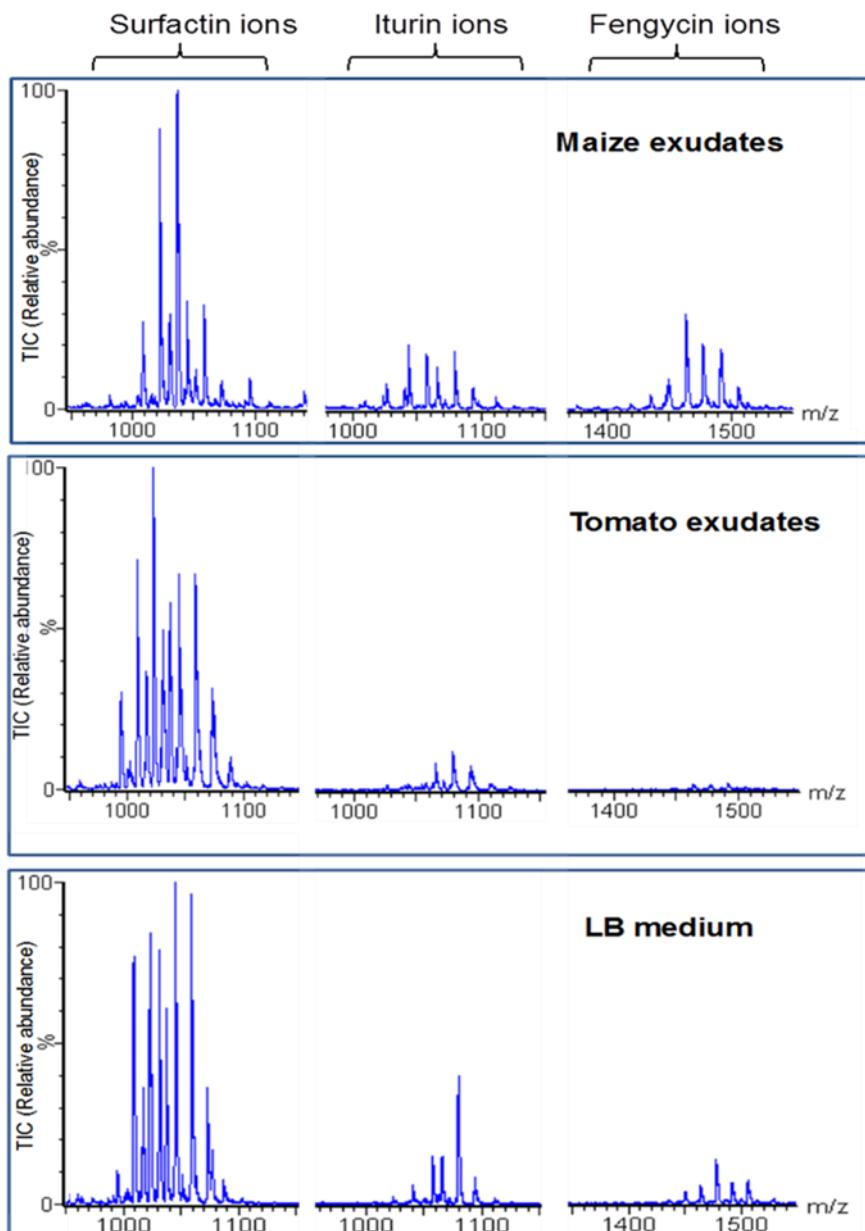


Figure 4.4. : Efficient production of fengycins by strain S499 in maize exudates. Extracted ion chromatograms of each lipopeptide family obtained by UPLC-ESI-MS analysis of extracts prepared from supernatants collected after cultivation of strain S499 in the three different media indicated. For each LP family, several peaks are detected which correspond to the various co-produced homologues differing in the length/isomery of the fatty acid tail. Y-axes representing the relative abundance of the ions are linked to the same scale.

4.3.3. Influence of temperature on the production of lipopeptides upon growth on maize exudates

We wanted to correlate the inhibition of the pathogens and the production of the antifungal compounds on these corn exudates. *Bacillus* strains were grown in the same exudate-based

medium in liquid cultures at 20°C ($OD_{600} = 0.55 \pm 0.15$) and 29°C ($OD_{600} = 0.62 \pm 0.11$) on 96 well microplate. The supernatant was recovered from a fresh culture made on seed exudates and before extraction, the lipopeptides contained in the supernatant were concentrated under vacuum for 18 hours, while their extraction was made with methanol and their analysis by LC-MS, following the method described by Arguelles-Arias et al. (2009). UPLC-MS analysis revealed that all strains produced the three main families of CLPs on corn exudates although there is variation according to strains and type of CLPS, but surfactins are the most produced in large quantities compared to other families at all temperatures. A comparison of the strains shows that QST713 and S499 produced large quantities of surfactins and iturins compared to other strains. The variety of co-produced homologues and variants detected on the basis of the m/z ratio within each family is illustrated in Table 1. It corresponds to the CLPs that were previously identified as produced by *Bacillus sp*, i.e. surfactins containing 12 to 16 carbon atoms in their fatty acid chain, iturins A/mycosubtilin (C14, C15 and C16 homologues) and fengycins homologs (C14-C18) of the A and B variants, which differ by the substitution of an alanine residue by valine in their peptide chain (Nihorimbere et al. 2012; Debois et al. 2014). Although the two strains S499 and QST713 were the best in terms of lipopeptide production on corn exudate, the S499 strain was even better in that it produced even more fengycins compared to the other strains including QST713 at all temperatures. Fengycins production is about three times that of QST713 at 20 °C and about twice the 98S whereas GA1 produces fengycins on corn exudate in very small quantities at 20 °C. Interestingly, at 29 °C and 20°C, S499 produced even more surfactins, fengycins and iturins in significant quantities compared to other strains (Fig.4.5). Based on these results, we made further experiments to assess the ability of this strain S499 to produce lipopeptides upon root colonization and in comparison with the artificial media (See next section).

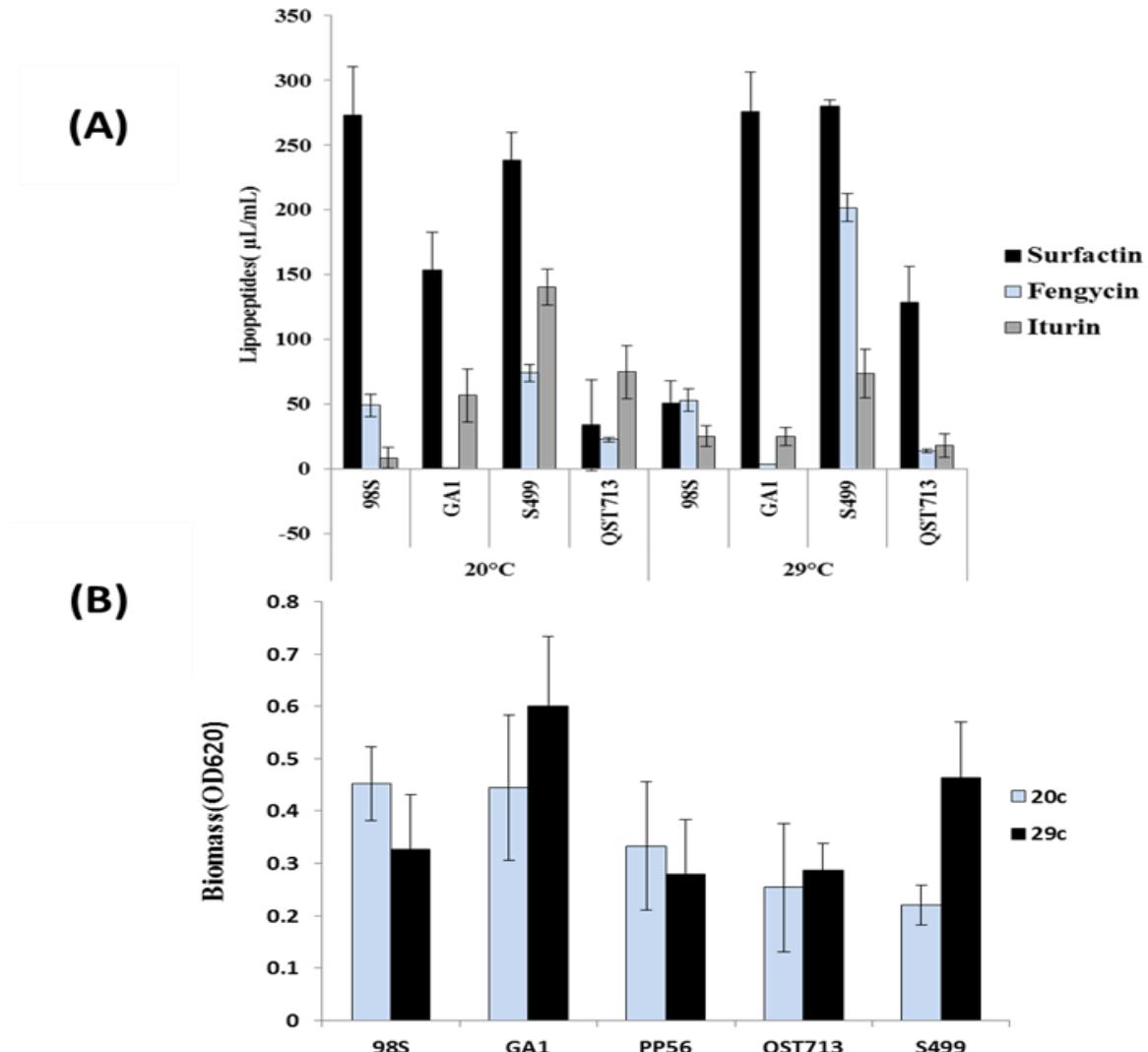


Fig.4.5. : (A) Production of the three families of lipopeptides by strain *B. amyloliquefasciens/Subtilis* strains and *Paenibacillus polymixa* PP56 upon growth in exudates collected from maize seedling as sole nutritional source (liquid) for 48h at the two indicated temperatures. (B) Bacterial biomass produces in exudates collected from maize seedling as sole nutritional source (liquid) for 48h at the two indicated temperatures.

4.3.4. Effect of temperature on the relative proportions of LP homologues

As regards to the proportion of surfactins homologues, S C12 / SC13 / SC14 / S C15 / SC16 and C17, were those which were secreted at both temperatures on corn exudates. The SC16 and C17 are those which have been produced in a small proportion compared to the other variants. It is, however, interesting to note that SC13 / SC14 and SC15 was secreted in large proportions at both temperatures with a proportion of 27% for 98S, 25% for GA1, 30% for QST713 and 15% / 23% / 23% for S499 at 20°C.

The same trend was observed at 29 ° C except that the difference was at C17 level which was not detected for strains 98S, QST713 and GA1. S499 is therefore the only strain which has secreted C17 at the two temperatures of 20 and 29°C.

Globally, SC13, SC14, SC15 and SC116 together represent more than 80% of the total surfactins produced on maize exudate. With the exception of SC17, there were no significant differences between the SC17 proportion for the S499 strain and these results corroborate those of Nihorimbere et al., 2012 which did not find the influence of temperature on the secretion of homologues SC12 / SC13 / SC14 / SC15 and C16.

For fengycins FC15, FC16, FC17 and FC18 are the most highly produced at both temperatures, FC19 is also produced in large proportion. The high proportion of FC16, FC17 and FC18 E between 20.25 and 30°C was also observed with Nihorimbere *et al.* in 2012 on tomato exudates. The iturins IC14, IC15 and IC16 are the only homologues that have been produced at both temperatures.

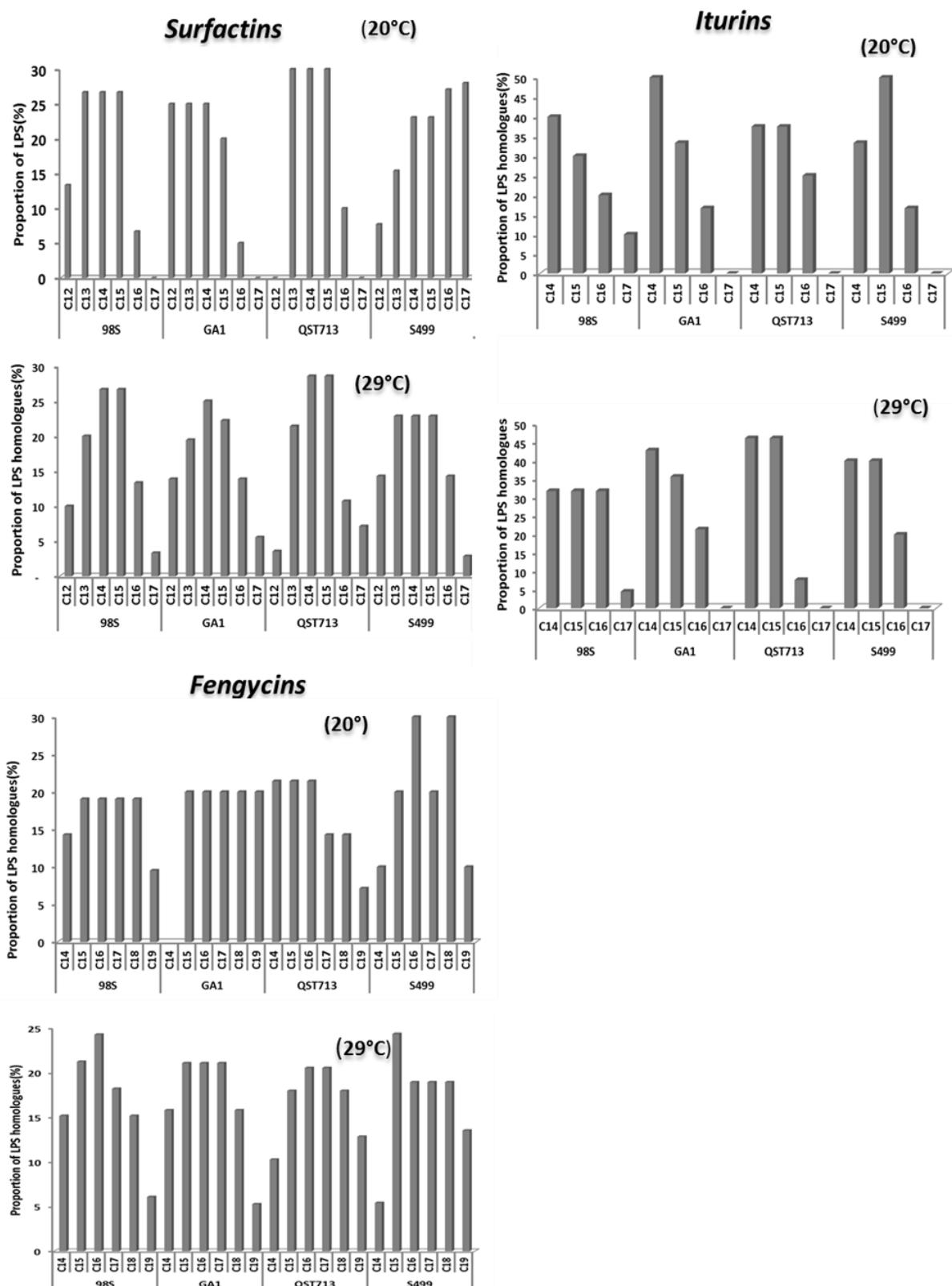


Fig. 4.6. Relative proportions of homologues varying in length of fatty acid chain within the three families of LPs according to temperature of growth (20 and 30° C) on maize exudates.

4.4. LIPOPEPTIDES PRODUCED BY *BACILLUS* spp PLAY A MAJOR ROLE IN THE INHIBITION OF PATHOGENS

4.4.1. Pathogen inhibition by *Bacillus* spp on maize exudates correlates with the differential accumulation of lipopeptides in the inhibition zone

After observing better growth of all *Bacilli* on exudate from ungelled corn seeds, and that S499 and QST713 strains were those which produced a large amount of the lipopeptides, additional experiments were performed to correlate the accumulation of lipopeptides in the inhibition zone and the inhibition of pathogens. These experiments were performed on maize-seed and root exudates from plants that were elevated under gnotobiotic conditions (sterilized perlite as growth substrate) in order to evaluate the possible antibiotic production of QST713 and S499 *in planta* when biological control agents (*Bacillus*) are confronted with pathogens. Plate confrontation assays were thus performed on maize root and seed exudates gelified medium. A significant inhibition zone occurred after four days of incubation. Compounds accumulating in that zone were extracted from 1 cm-diameter plugs, and analyzed by UPLC-MS after solid-liquid extraction. Data were compared to those obtained from pure cultures of the bacterial strain and performed under the same conditions. Again, lipopeptides were the only compounds that were detected in significant quantities in those extracts. Interestingly, the amounts of lipopeptides families in the inhibition zone was higher when *B. QST713* and *S499* was grown in confrontation with the fungus, whereas the presence of the pathogen did not have a positive or negative impact on the production of iturins or surfactins (Fig. 4.7). Data were compared to those obtained from pure cultures of the bacterial strains and performed under the same conditions.

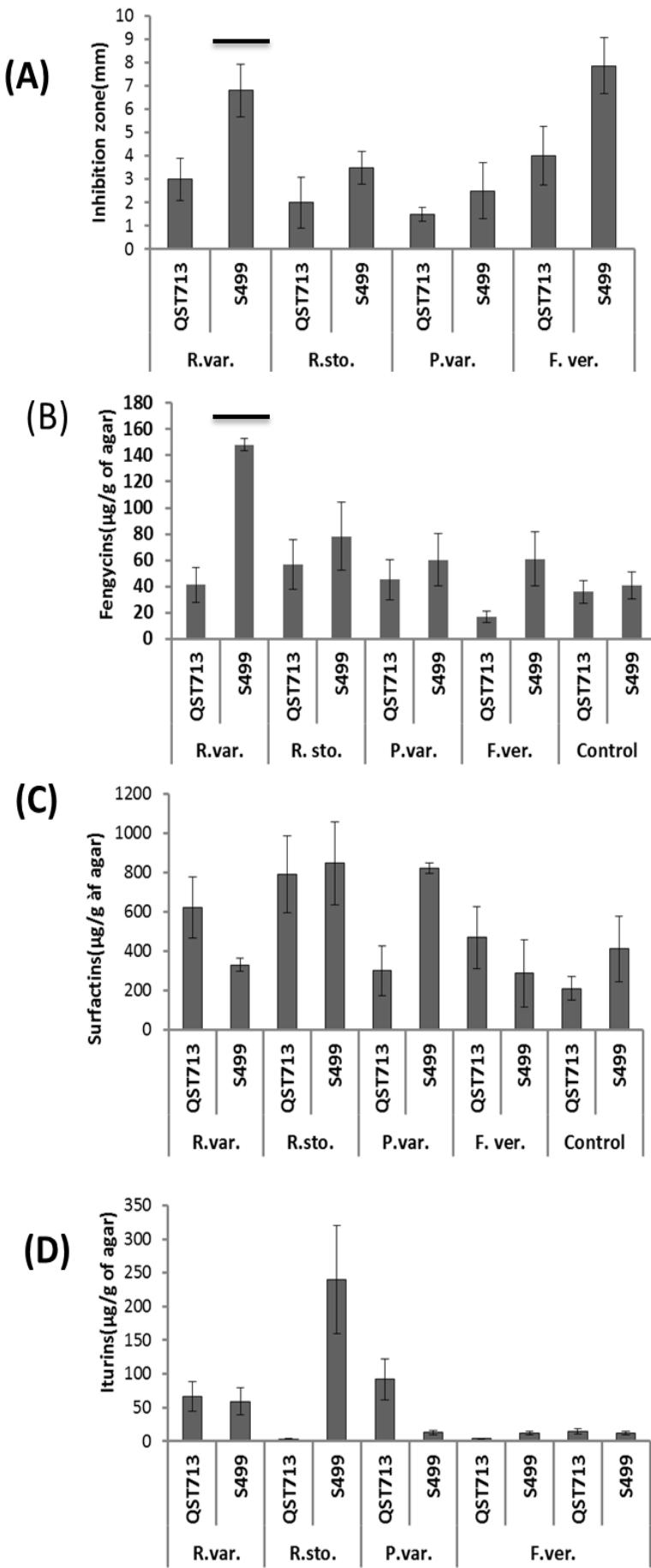


Fig.4.7. (LPs) secreted by strain QST713 and S499 upon growth in maize exudates. LPs concentration (in the inhibition zone and intensity of the antagonism. Agar samples were taken from the inhibition zone extracted with 50% ACN and analysed for LP content by UPLC-MS. Presented data are means from four biological repeats. (A) Inhibition zone on roots exudate, (B) Fengycins concentration in inhibition zone on roots exudate. (C) Surfactins concentration in inhibition zone and (D) Iturins in inhibition zone on roots exudates.UPLC-ESI-MS chromatogram(E) illustrating the variety of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 and S499 upon growth in exudates collected from maize seedling as sole nutritional source (MRE medium). Extracted ions typical for surfactins, iturins and fengycins and representing the various homologues within each lipopeptide family are detailed in Table 4.2.

The results of fig.4.7 show a strong inhibition of *R. variabilis* and *R. stolonifer* by S499 compared with the other pathogens although this inhibition is even stronger with *R. variabilis*. However, it should be noted that QST713 also exhibits a significant inhibition against *F. verticilloides* as compared to S499. A correlation with the production of lipopeptides in inhibition zone shows an overproduction of fengycins by S499 in the presence of *R. variabilis* compared to the control and to the other strains of *Bacillus* confronted with the different pathogens. As regards the QST713 strain, there is a slight non-significant fengycins production recovered in the zone of inhibition with respect to the pure culture taken as control. With the confrontation with *R. variabilis* and *P. variabile*, we also observed a stimulation of fengycin production in S499 and QST713. In confrontation between QST713 and *F. verticilloides* fengycins production was decreased compared to the pure culture of this bacterium regarded as a control. Regarding the surfactins, they were also produced in high quantities in inhibition zone with all pathogens, except for S499 with *R. variabilis*. The iturins were also produced in sufficient quantities in inhibition zone of pathogens, but this time the greatest production of iturins was observed in the zone of inhibition of *P. variabilis*.

Based on comparison of molecular masses (m / z) to other already identified lipopeptides (Ongena et al 2005. Ongena and Jacques, 2008), we identified three main families of lipopeptide antibiotics in inhibition zone (Surfactins, Iturins and fengycins). The synthesized lipopeptides includes the surfactins, whose molecular weights are between 994.5 to 1051.79 Da (m / z) when it's ionized with H + and molecular weights M / z ranging from 1016.43 to 1072.64 Da when ionized with Na +. They are constituted in their peptide ring of chain acid fatty β -hydroxylated linear or branched containing from 12 to 16 Carbon atoms (c12, C13, C14, C15 and C16). Two variants of iturins were also produced by *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713 and S499 in confrontation with pathogens on MRE. These are iturins A or myco-subtilin with chain fatty B-amino acids whose length has 14-16 carbon atoms (C14, C15 and C16) with molecular weights of 1043.60 m / z, 1057.6 m / z and 1071.59 m / z [MH] and Iturins C whose length has 14 to 16 carbon atoms. The iturins A were the most abundant compared to the others Iturins. This would explain in part effectiveness of *Bacillus* S499 and QST713 on maize pathogens because iturins A are known for their hight antifungal activity ((Peypoux et al, 1978 Obagwu & Korsten, 2002 Lax, 1991. Yu et al. 2002). Regarding the fengycins; homologs and isoforms produced in inhibition zone by QST713 and S499 strains belong to the fengycins A (s) and B (val) which have respectively the alanine and the valine residues in their amine acid chain (Hbid, 1996, Steller et al, 1999). The mass spectra and the main lipopeptides famillies

identified are presented in Table 4.2. The fengycins A have in their peptide cycle B -amino fatty acid chains consisting of 14 to 19 carbon atoms (C14-C19) assigned [M -Na] + and molecular mass M / Z at 1435.65 to 1506.93 Da. While for fengycines B, the peaks detected after analysis by ESI-LC- MS varies between 1463 to 1506 Da with an amino acid chain length of 15 carbon 17 atoms.

Table 4.2. Metabolite production of *B. amyloliquefaciens* QST713 and S499 detected by HPLC-ESI mass spectrometry in inhibition zone

<i>Bacillus amyloliquefaciens S499</i>					
Surfactines		Fengycines		Iturines	
Mass [M-Na]+	Molecule	Mass	Molecule	Mass	Molecule
Iturines					
1016.43	C12	1435.65	C14	A	
1030.38	C13	1449.94	C15	1044.78	C14
1044.78	C14	1463.71	C16	1058.67	C15
1058.67	C15	1477.74	C17	1071.42	C16
1072.56	C16	1492.66	C18		
		1505.72	C19		
Mass [M+H]+	Molecule	Mass	Molecule	Mass	Molecule
Iturines					
994.54	C12	1463.71	C16	B	
10008.57	C13	1477.74	C17	1065.34	C14
1022.52	C14	1492.66	C18	1079.37	C15
1036.65	C15	1505.72	C19	1093.65	C16
<i>Bacillus amyloliquefaciens QST713</i>					
Mass [M-Na]+	Molecule	Mass [M-Na]+	Molecule	Mass	Molecule
Iturine					
1016.52	C12	1463.71	C14	A	
1030.63	C13	1477.66	C15	1043.6	C14
1044.66	C14	1491.69	C16	1057.6	C15
1058.61	C15	1506.93	C17	1071.59	C16
1072.64	C16				
Mass [M-H]+	Molecule	Mass [M-Na]+	Molecule	Mass	Molecule
Iturine					
995.7	C12	1435.81	C14	B	
1008.57	C13	1449.63	C15	1065.5	C14
1022.6	C14	1463.79	C16	1079.63	C15
1036.63	C15	1477.66	C17	1093.48	C16
1051.79	C16	1491.85	C18		
		1506.77	C19		

4.4.2. Antifungal activity of semi-purified CLPs

We carried out an additional assay to test the capacity of these lipopeptides to inhibit the spores of the different pathogens at different concentrations. Lipopeptides were then semi-purified via solid-phase extraction and further tested for fungal growth inhibition as a mixture of surfactin/iturin/fengycin (relative proportions of 51/32/17 % in weight) at various concentrations ranging from 5 to 160 µg/ml in microtiter plates. Results in Fig. 4.8 showed that those compounds were inhibitory for growth of the three pathogens in a dose-dependent trend. *Fusarium verticillioides* is clearly the most sensitive target with a marked decrease in growth performance in the presence of 10 µg/ml of CLPs and an IC₅₀ around 30 µg/ml. Significant inhibition of *Rhizopus stolonifer* and *P. variabile* development required at least addition of LPs at 40 µg/ml with an IC₅₀ around 80 µg/ml.

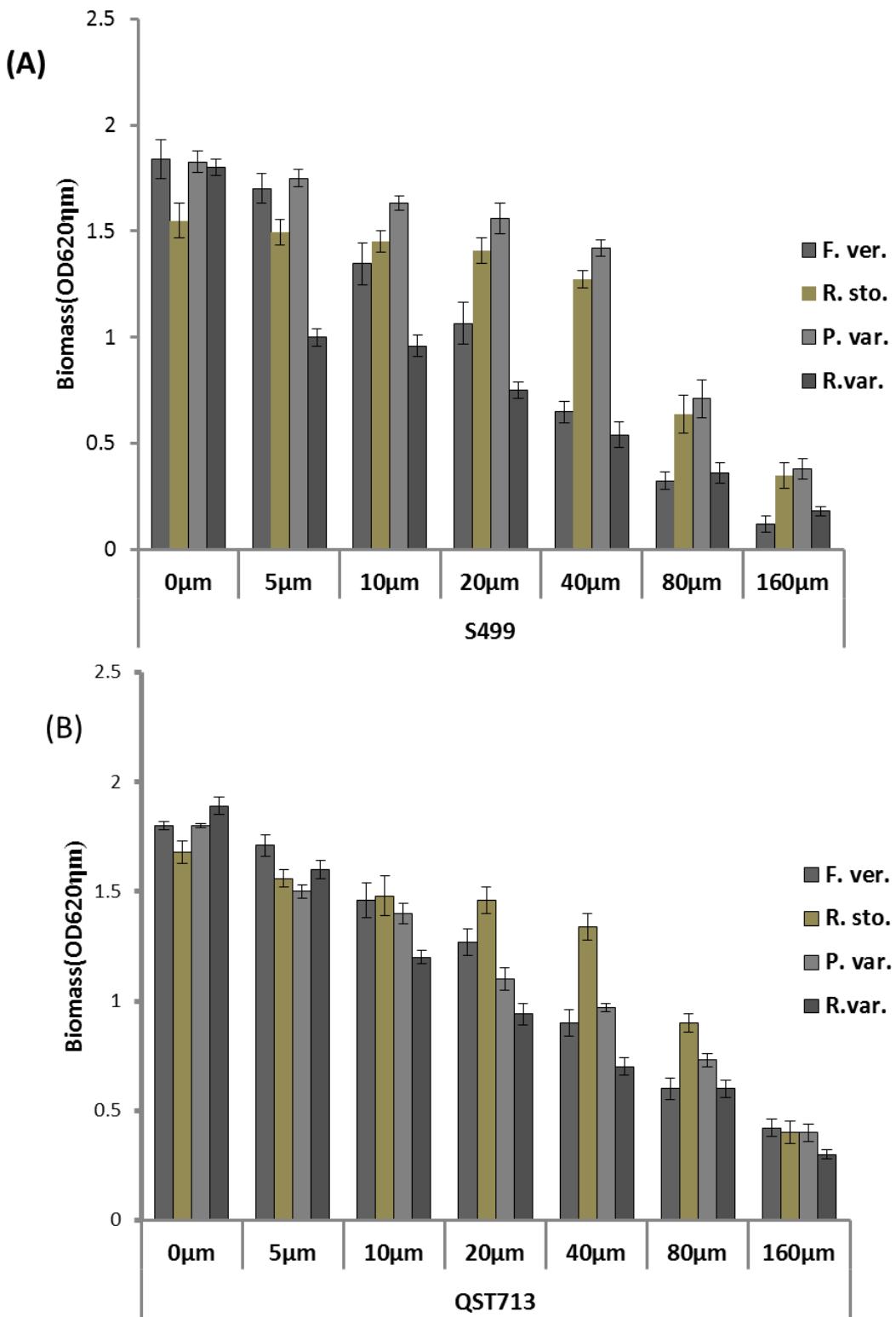


Fig.4.8: Effect of semi-purified lipopeptides (added as a mixture of the three families) on spore germination and growth of the four pathogens in 96-well microplates (A_{620nm}) at different concentrations. Means and s.d. were calculated on the basis of five replicates.

4.4.3. Fengycins are the main lipopeptides formed by S499 restricting growth of *R. variabilis*

In order to investigate the role of each lipopeptide family in the control of *R. variabilis*, we first compared the growth inhibition activity on MRE medium of several strains and mutants of *B. amyloliquefaciens/subtilis* producing different combinations of the three families of CLPs. Strains FZB42 and S499 both co-producing iturins, surfactins and fengycins, were able to inhibit the growth of the fungus even if S499 displayed a slightly higher antifungal activity. This is in accordance on data regarding lipopeptides accumulation in inhibition zone (Fig.4.9).

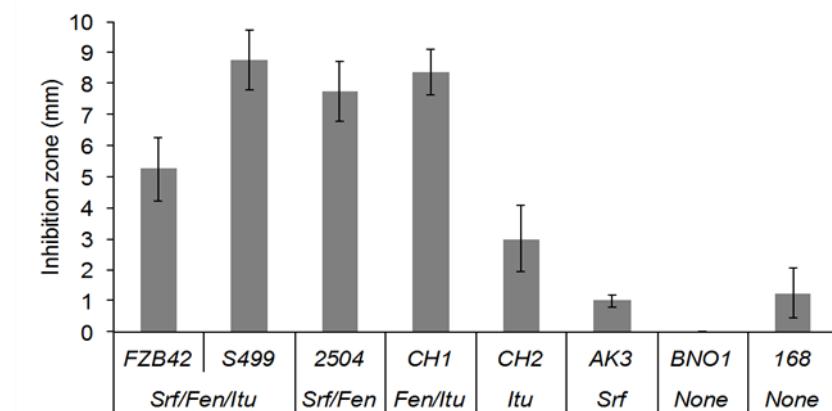


Figure 4.9 : Fengycins as main ingredients formed by S499 that are active to restrict growth of *R. variabilis*. Antifungal activity of various *Bacillus* strains against *R. variabilis* related to the type of CLPs family (Srf: surfactins; Fen: fengycins; Itu: iturins; None: no CLPs) that they can produce. Strains unable to produce fengycins do not show any antifungal activity. Presented data are means and s.d. calculated from 4 biological repeats.

Strains that do not produce lipopeptides or only very low amounts such as *B. subtilis* BNO1 and *B. subtilis* 168 were not able to inhibit growth of the pathogen highlighting the role of lipopeptides in the antifungal bioactivity. FZB42 derivatives specifically repressed in the synthesis of CLPs (Cawoy et al., 2015; Chen et al., 2006; Jourdan et al., 2009; Koumoutsi et al., 2004) were also included in the experiment. Obtained from the natural strain FZB42, the mutants CH1 and CH2 both producing iturins but not able to form surfactins, only differ from each other in fengycin synthesis which is repressed in CH2 but conserved in CH1. Comparison of antifungal activities of CH1 and CH2 revealed that fengycin production had a strong impact on *R. variabilis* growth indicated a clear involvement of this CLP in fungal inhibition (Figure 5). Also surfactin does not play any role in antifungal activity, based on the rather low inhibitory effect of the mutant AK3 also obtained from FZB42, which produces surfactins but is repressed in the synthesis of the two other families. Interestingly, CH1 is more active than the WT strain

FZB42, suggesting that surfactins could somehow interfere with fengycin activity. This arises from the fact that the two lipopeptides may interact to probably form a kind of precipitate yielding a «white line» visible around the colonies co-producing all three LP families during antagonism. This was observed for FZB42 and other strains co-producing the three CLP families (Cawoy et al., 2015). Such a phenomenon has also been reported for *Pseudomonas* CLPs involving the lipopeptide so-called WLIP (With Line Inducing Principle) (Rokni-Zadeh et al., 2013). Since *B. amyloliquefaciens* CH2 is still able to slightly inhibit the growth of the phytopathogen, iturins may contribute albeit to a much lower extent, to antifungal activity. The importance of fengycins in the global antifungal effect of *Bacillus* toward *R. variabilis* was also supported by the inhibitory activity of *B. subtilis* 2504, a derivative of the non active *B. subtilis* 168, in which efficient production of fengycins was restored (Ongena et al., 2007; Nihorimbere et al., 2009).

Based on these results, pure fengycins were tested both in a well diffusion assays for mycelium growth inhibition and in microtiter plates allowing to test the lowest inhibitory concentrations. As shown in Figure 6A, fengycin concentrations ranging from 73 to 18.5 μ M were inhibitory for mycelium growth on MRE agar plates in a dose response manner. Smaller concentrations from 18.5 μ M to 2.5 μ M were also tested in liquid cultures for inhibition of conidia germination and a significant decrease in OD620 was observed by adding pure fengycins at concentrations as low as 4.5 μ M, which roughly corresponds to the minimal inhibitory concentration (MIC) (Fig.4.10).

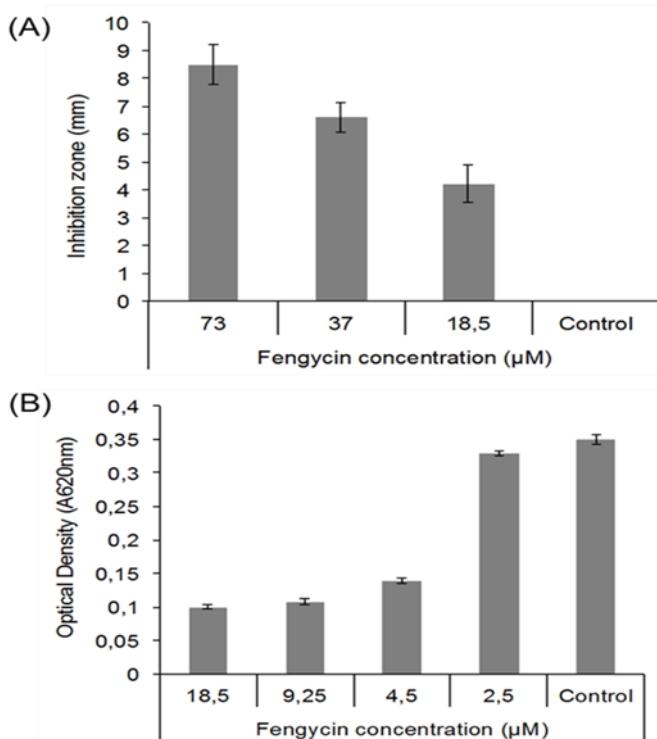


Fig.4.10: *Fengycin effect on mycelial growth and sporulation of R. variabilis.* (A) Effect of pure fengycins on *R. variabilis* growth on PDA plates after 48h at 25°C in a well-diffusion assay. All tested concentration were able to inhibit growth of fungal mycelium. (B) Effect of pure fengycin on sporulation of *R. variabilis* grown in 96-well microplates. Fungal growth was evaluated by measuring OD at 620nm in presence of different concentrations of fengycins. 4.5 μM is the minimal inhibitory concentration capable of inhibiting the growth of the pathogen. Pure fengycins (purity >99%) were diluted in 50% methanol. Control: 50% methanol. Data are from three independent repeats.

4.4.4. Conclusions

This work first illustrated the efficacy of some members of the *Bacillus amyloliquefaciens* species and more specifically of the strain S499 at inhibiting *Rhizomucor variabilis*, a newly isolated endemic fungal pathogen infesting both maize plants in field and ears under post-harvest storage in DR Congo. Our strategy was to further study this antagonistic activity by making both partners interacting upon growth in maize seedling exudates as a nutritional context more representative of natural conditions than the artificial media classically used for that purpose. S499, like other members of the *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* taxon is known to produce a panoply of antimicrobial compounds among which cyclic lipopeptides of various structural types (Debois et al., 2014; Chowdhury et al., 2015; Molinatto et al., 2016). Data presented here actually show that this lipopeptidome is readily expressed

when the bacterium feeds on these maize exudates as sole nutritional source. Based on the loss of function of specifically repressed mutants and on the activity of purified compounds, it is clear that the fengycin-type lipopeptides mainly contribute to the antifungal potential of strain S499 against *R. variabilis*. This is to our knowledge the first report on fengycin inhibitory activity toward that particular pathogen with a quite low MIC in the μM range. Additional studies revealed not only the colonization of the roots by B. S499 but also the production of fengycins in large quantities on corn exudate compared to the artificial medium used for this purpose as well as those of other crops such as tomatoes. These results demonstrate quality of corn exudate not only to support the growth of bacillus but also the production of lipopeptides involved in fungitoxic effects.

CHAPTER 5. STIMULATION OF FENGYCIN-TYPE ANTIFUNGAL LIPOPEPTIDES IN *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* IN THE PRESENCE OF THE MAIZE FUNGAL PATHOGEN *RHIZOMUCOR VARIABILIS*

5.1. INTRODUCTION

Most of bacterial isolates belonging to the *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* clade retain the potential to produce a vast array of structurally diverse antimicrobial compounds that largely contribute to their efficacy as biocontrol agents against plenty of plant pathogens. In that context, the role of cyclic lipopeptides (CLPs) has been well documented. Different physico-chemical factors inherent to the rhizosphere ecology are known to modulate CLPs production but still little is known about the impact of other soil-inhabiting microbes on the expression of these molecules. Fengycin is a class of lipopeptides initially isolated from *Bacillus subtilis* (Ongena M et al.,2005), which has shown promise as an antifungal agent for use in plant disease control. Natural fengycins are produced from a variety of bacterial strains have been used to treat many agricultural infections: root disease (*Plasmodiophora brassicae*) in cruciferous plants, corn rot (*Fusarium moniliforme*), the burning of the barley head (*Fusarium graminearum*), etc. They also serve as powerful biosurfactants able to induce cell lysis and membrane leakage (Hiren Patel et al., 2008).

In this work, we investigated the antagonistic activity developed by this bacterium against *Rhizomucor variabilis*, a rare pathogen isolated from diseased maize cobs in Democratic Republic of Congo. Our understanding of the cellular regulatory processes driving CLP synthesis in *Bacillus* and other bacterial species like *Pseudomonas* has been improved in the last decade thanks to major advances in comparative genomics and transcriptomics. However, very little is still known about the possible impacts of the multitrophic interspecies or interkingdom interactions occurring in the rhizosphere (or phyllophshere) on the production of key biocontrol metabolites such as CLPs. After observing that fengycins were the main compounds involved in the inhibition of *R. variabilis* in the previous chapters, we wanted to understand through this work whether the synthesis of fengycins by S499 is induced in the interaction with *R. variabilis*. Indeed, the dynamics of the production of lipopeptides by the S499 strain in comparison with *R. variabilis* was studied in more detail on MRE agar plates by

LC-MS and RT-qPCR by ensuring that both partners could interact in this tripartite interaction rhizobacteria-plant-pathogen in the objective of knowing if the bacterium is able to perceive the molecular signal emitted by *R. variabilis* and modulate overproduction of lipopeptides.

5.2. MATERIALS AND METHOD

5.2.1. Impact of *Rhizomucor variabilis* on lipopeptide production

The results of the previous chapter (chapter 4) in fig. 5B, which reproduces the results concerning the antagonism against the Pathogens on MRE by correlating inhibition by *Bacillus spp* with the differential accumulation of lipopeptides, had already predicted the production in large quantities of fengycins in the presence of *R. variabilis* compared to other pathogens. Basis of these results, we wanted to study in detail the dynamics of the production of lipopeptides by S499 in the presence of *R. variabilis* on MRE (reflecting the natural conditions of the rhizosphere) by combining the analytical chemistry method by LC- MS and technics of molecular biology by RT-qPCR. Our strategy was to make the two microorganisms more interact.

A plug of mycelium from gelified PDA plates was sampled and placed in 10 mL of salt peptone water (5 g/L NaCl, 1 g/L peptone and 0.2 % Tween 80). After centrifugation (10.000 rpm for 5 minutes) 10 µL of the solution was used to inoculate 10 times diluted MRE medium petri dishes and incubated for 18h at 25°C. Afterwards, a bacterial colony from an overnight culture on solid 868 medium was picked up and striated on both sides of the already inoculated fungus (2 cm between both microorganisms) 18h after the cultivation of fungus. Agar plugs were sampled in the inhibition zone after 8, 12, 14, 16, 18 and 24 h of culture for further lipopeptide quantification via UPLC-MS while bacterial cells were scrapped from the producing micro-colonies at the same time-points for gene expression measurements by RT-qPCR).

5.2.2. RT-qPCR analysis of CLP gene expression

RNA purification was done using a NucleoSpin® RNA isolation kit (Macherey-Nagel, Germany) from cells coming from 15g of agar in the inhibition region. The concentration of RNA was measured using a Thermo Fisher Scientific NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer. A quantity of 50ng RNA was used as a template for RT-qPCR (StepOne

Real-Time PCR thermal cycler system, Thermo Fisher Scientific) for fengycin gene expression (primers *fenC*_for: CTGAATCTCTGCGCCATGT and *fenC*_rev : TGATCTGCTGTGCTCCTCA) using qPCR BIO SyGreen 1-Step Hi-Rox (NIPPON GENETICS, Germany) according to manufacturer's protocol. Experiment was performed in triplicate, and negative controls were included for each sample. Gyrase gene expression was used as the reference gene (*gyrA*_for: GAGACGCCTGAAATCGTGA *gyrA*_rev: GCCGGGAGACGTTAACATA). The protocol was: denaturation at 95.0 °C for 15 min; 35 cycles of denaturation at 94.0 °C for 10 s, annealing at 58.0 °C for 25 s, extension at 72.0 °C for 30 s and a final melting curve from 60.0 °C to 95.0 °C for 6 min. The samples were run in triplicate for each target gene, and negative controls were included for each sample.

5.2.3. Assays to test the effect of volatile compounds

The effect of fungal volatile compounds (VOCs) on CLPs production was evaluated on MRE medium using two-compartments Petri plates (Fernando et al., 2005; Chaves-Lopez et al., 2015). In the first compartment, the bacterium was inoculated by depositing a 10 µl drop of a cell suspension adjusted to an OD of 0.1, whereas in the second compartment, a mycelial disc of freshly pre-cultured *R. variabilis* was deposited. Plates were incubated for 4 days at 25°C and the influence of VOCs on the production of LPs was determined by comparing as described above, the amount of compounds released under these conditions (see above for extraction and quantification by UPLC-MS) with those formed in control plates not inoculated with the pathogen.

5.2.4. Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance of two classification criteria through Statistix 8.0 software and means from the different treatments were compared using least significant difference of means test (LSD) at α 0.05).

5.3. RESULTS

5.3.1. Fengycin synthesis by S499 is induced upon confrontation with *R. variabilis* on gelified medium

The dynamic of lipopeptide production by strain S499 in confrontation with *R. variabilis* was further investigated on MRE agar plates with 18h-delayed inoculation of the bacterium in the vicinity of expanding fungal mycelium. Time-course UPLC-MS profiling of CLPs in the inhibition zone revealed a clear stimulation of fengycin production (up to 10-fold higher amounts) between 8h and 18h following *Bacillus* inoculation compared to control plates (Fig.5.1). The same experiments were also performed with two other well-described *B. amyloliquefaciens* isolates in order to appreciate the strain specificity regarding such communication between *Bacillus* and *R. variabilis*. It seems that the stimulation of fengycin may also occur for other strains since a similar effect of the fungus, albeit lower in amplitude (5.2-fold increase in fengycin amounts recovered at 18h post inoculation), was observed with strain FZB42 but doesn't seem to apply for all members of this species since no stimulation was detected in the case of strain QST713.

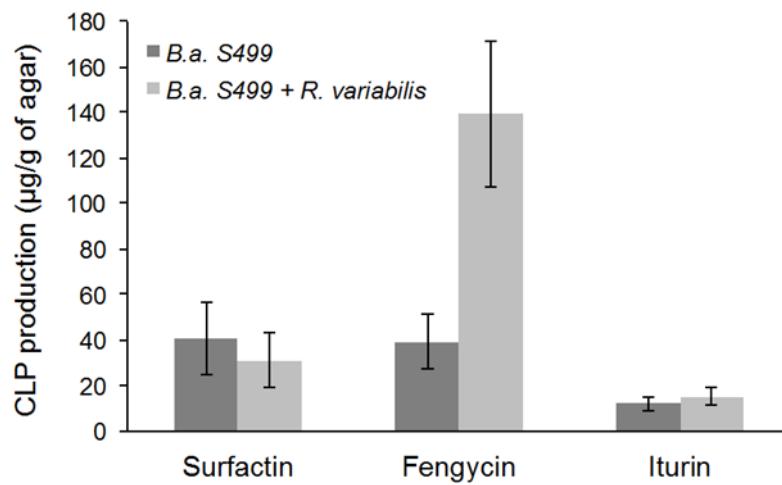


Fig.5.1: Determination of lipopeptides accumulating in the inhibition zone upon confrontation of strain S499 with *R. variabilis*. Production of surfactin, fengycin and iturin by *B. amyloliquefaciens* S499 evaluated by UPLC-MS in presence (light grey) or absence (dark grey) of *R. variabilis*. Microorganisms were grown together for 4 days at 25°C. Data are means and s.d. calculated from the analyses of four extracts prepared from independent plates.

Increasing in fengycin production correlated quite well with an enhanced expression of the corresponding biosynthesis genes as analyzed by RT-qPCR from the producing bacterial colonies. Indeed, evaluation of the expression of the *fenc* gene showed that fengycin synthesis was overexpressed (Figure 5.2.B) at 12h after bacterial inoculation suggesting an early perception of some signal emitted by the fungus. This lipopeptide-inducing molecule emitted by *R. variabilis* most probably corresponds to a soluble compound diffusing in the gelfied medium since fengycin stimulation was not observed by growing the bacterium and the fungus under the same conditions but in two-compartments plates commonly used to test the role of volatiles in interspecies interactions (Fig.5.3, A, B and C). Indeed, the kinetics of overproduction of Fengycins showed a correlation between the production of fengycins with the genes involved in their biosynthesis throughout the experiment. However, it should be noted that this overproduction was even higher between 18h and 24h. The overexpressed of fengycins by S499 in the presence of *R. variabilis* compared to pure cultures suggesting that the bacterium is able to perceive some molecular trigger released by the pathogen and modulate fengycins surproduction.

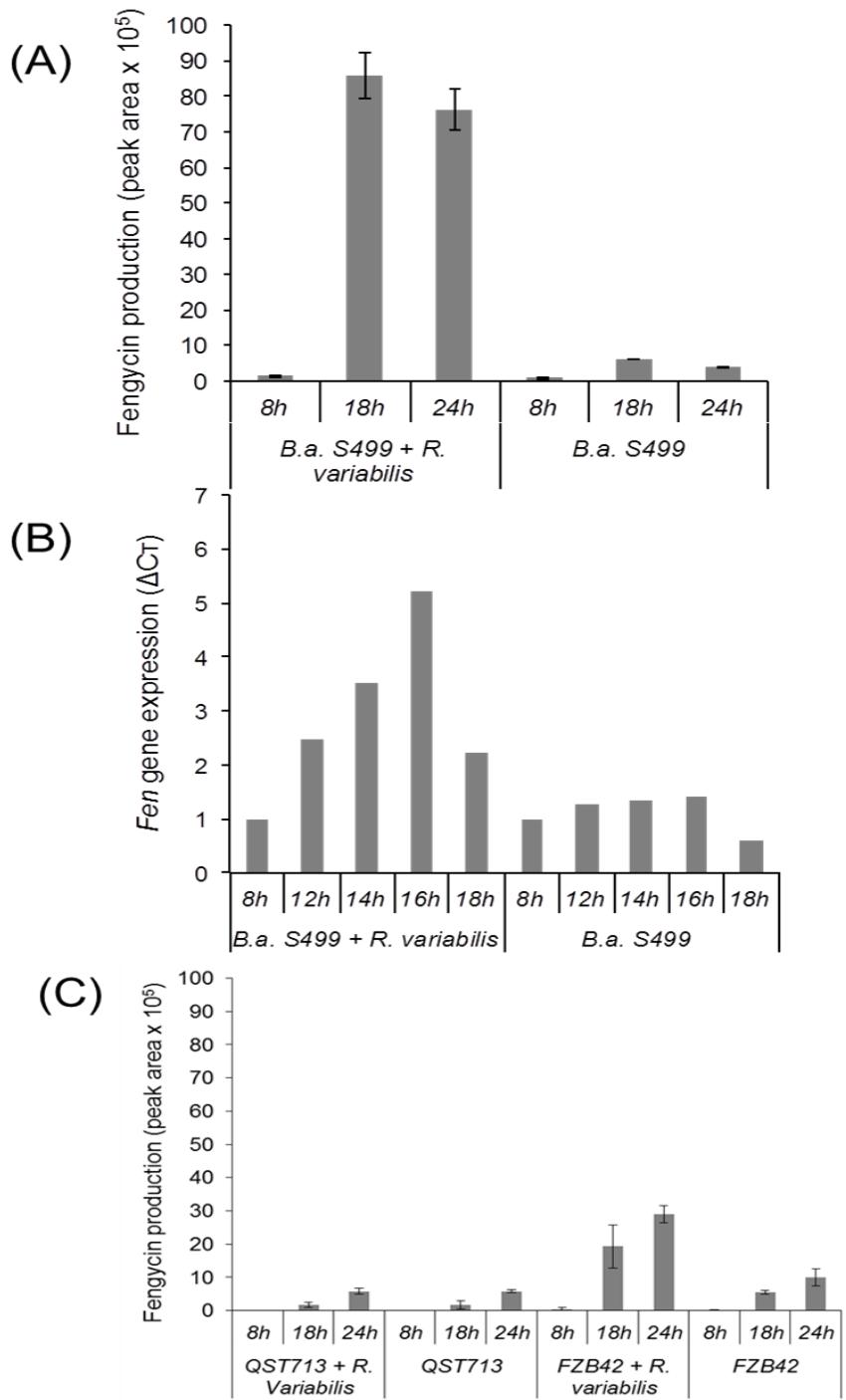


Fig.5.2. Impact of the fungus on the production of fengycin and *fen* gene expression: A) Evaluation of fengycin production by *B. amyloliquefaciens* S499 (B.a. S499), using UPLC-MS, in presence (B.a. S499 + *R. variabilis*) or absence (B.a. S499) of *R. variabilis* after 8, 18 and 24h. Positive impact of fungus is clearly visible after 18 and 24h of co-culture. (B) Correlation between *fen* gene relative expression (ΔCT) and the lipopeptide production. A positive impact on gene expression is clearly visible after 12h of growth when the fungal pathogen is present compare to culture of *Bacillus* alone. For UPLC-MS analysis, four samples have been considered where RT-qPCR experiments were performed in duplicate.

5.3.2 The effect of fungal volatile compounds (VOCs) on CLPs production

Many signaling molecules involved in communication between microorganisms are volatile compounds (COV) (Fernando et al., 2005; Chaves-Lopez et al., 2015; Giorgio et al., 20015). In this context, we analyzed whether stimulation of LP production was related to the VOCs released by the pathogen. The effect of fungal volatile compounds (VOCs) on CLPs production was evaluated on MRE Petri dish divided into two separate compartments (Fernando et al., 2005; Chaves-Lopez et al., 2015). In the first compartment, the bacterium was inoculated whereas in the second, a mycelial disc of *R. variabilis* was deposited; as a control, only the bacterium was inoculated. After 3 days at 25°C culture, the influence of VOCs on the production of CLPs was determined using UPLC-MS (Fig.5.3, A, B and C). The results obtained clearly showed that there was no influence of volatiles compounds on lipopeptides production, for the fengycins and the surfactins there were no significant differences between the control and the treatment where the bacteria were grown separately on petri dishes with double compartment. Similar results were observed with iturins. On the contrary, the control where the bacterium was grown alone has produce more iturins than the treatment. These results confirmed even more the non-involvement of the volatile compounds in the overproduction of the lipopeptides.

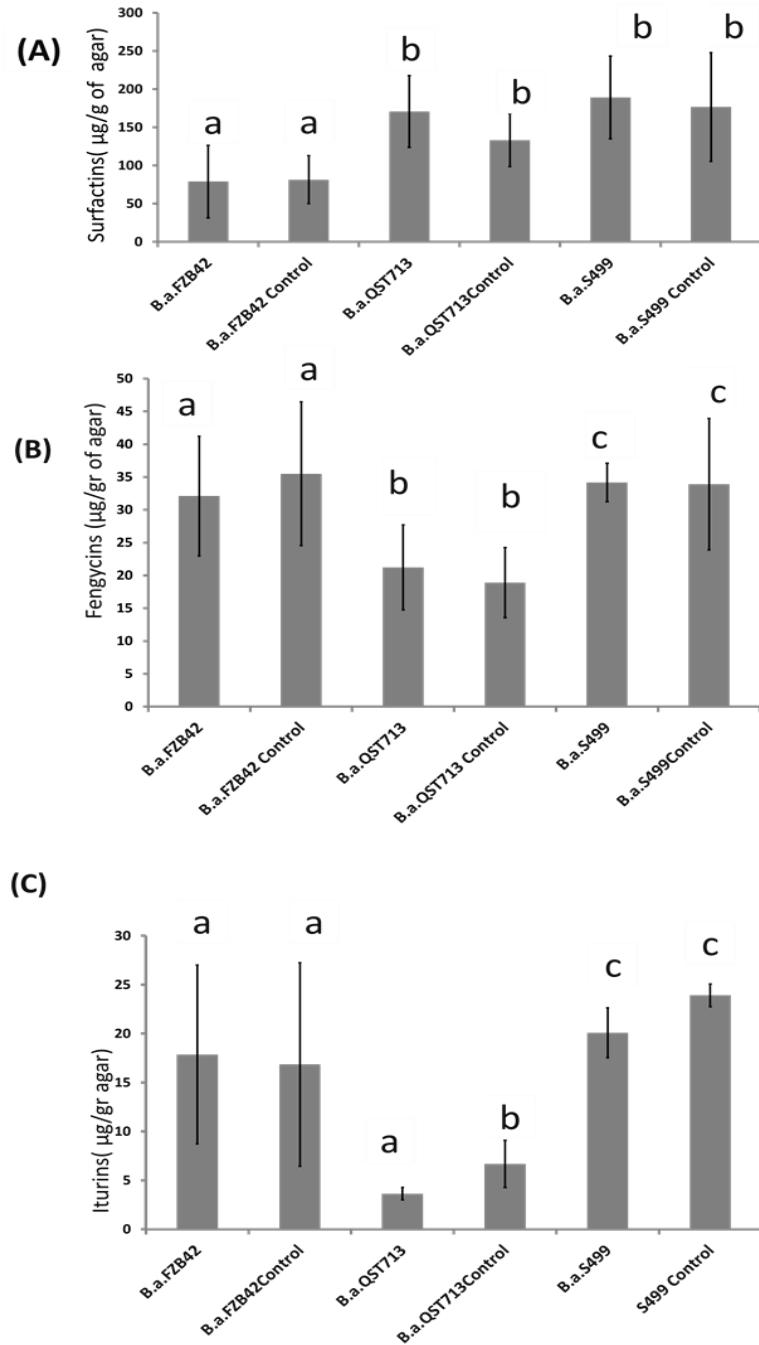


Fig.5.3. Impact of fungal volatile compounds (VOCs) on CLPs production. Effect of fungal volatile compounds (VOCs) on CLPs production was evaluated on MRE medium using two-compartments Petri plates (Fernando et al., 2005; Chaves-Lopez et al., 2015). In the first compartment, the bacterium was inoculated by depositing a 10 μl drop of a cell suspension adjusted to an OD of 0.1, whereas in the second compartment, a mycelial disc of freshly pre-cultured *R. variabilis* was deposited. Plates were incubated for 4 days at 25°C and the influence of VOCs on the production of LPs was determined by comparing as described above, the amount of compounds released under these conditions (see above for extraction and quantification by UPLC-MS) with those formed in control plates not inoculated with the pathogen.

5.3.3. Effect of coculture in liquid medium on the production of fengycin lipopeptides

Co-culture of strain S499 was carried out in liquid MRE medium in the presence of a fungal suspension of *R. variabilis* inoculated at a concentration of 1.10^7 spores / ml. The supernatant was collected after 4, 8 and 10 h of incubation at 29°C and analyzed by LC-MS.

The results showed no significant influence of coculture on the production of surfactins and iturins at any time (data not shown). However, significantly higher amounts of fengycins were recovered from the co-culture medium at 8h and 10h post-inoculation compared to pure bacterial culture (Fig. 5.4.). This is in agreement with data from confrontation assays on gelified medium where an earlier and higher production of this CLP occurred in the presence of the fungus (Fig.5.1).

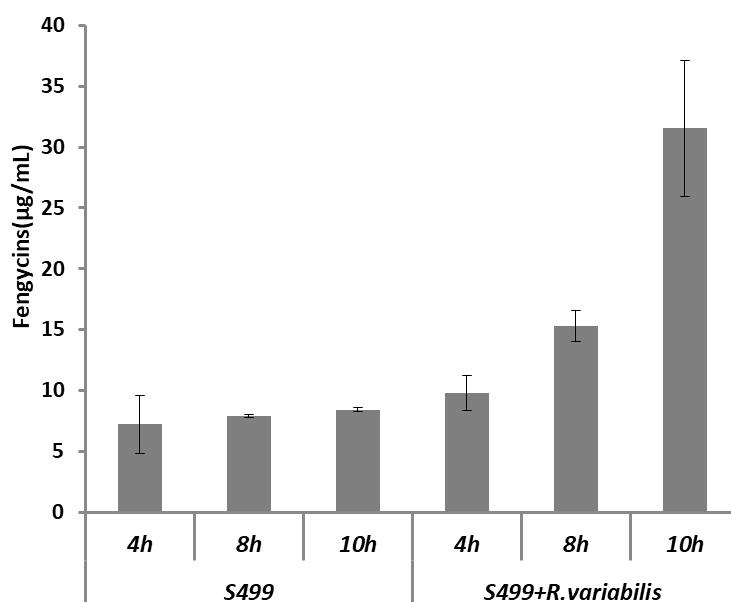


Fig.5.4: Influence of co-culture on the production of fengycins. A bacterial culture of OD 0.1 was carried out on liquid exudate with a fungal suspension of *R. variabilis* at a concentration of $1.4.10^7$ spores / ml. The supernatant was collected at 4.8 and 10 h and analyzed by LC-MS. The means are derived from 4 repeats ($n = 4$).

5.4. CONCLUSION

We have demonstrated through this work that the synthesis of fengycins by S499 is induced during the interaction with *R. variabilis*. Indeed, the dynamics of the production of lipopeptides

by the S499 strain in comparison with *R. variabilis* was studied in more detail on MRE agar plates with late 18-hour inoculation of the bacterium in the vicinity of the fungal mycelium of *R. variabilis* in expansion in comparison with a pure bacterial culture as a control. The real-time UPLC-MS profile of CLPs in the inhibition zone revealed a clear stimulation of fengycin production (up to 10-fold) between 8 am and 6 pm after *Bacillus* inoculation compared to Plates. The same experiments were also performed with two other well-described *B. amyloliquefaciens* isolates in order to assess the strain specificity for such communication between *Bacillus* S499 and *R. variabilis*. It appears that stimulation of fengycin may also occur for other strains because a similar effect of the fungus, although lower in amplitude (5.2-fold increase in the amounts of fengycin recovered at 18 h after inoculation) Was observed with strain FZB42 but does not appear to apply to all members of this species since no stimulation was detected in the case of strain QST713. After analysis by RT-qPCR and LC-MS our results also showed a correlation between the increase in fengycin production and the genes expression of fengycin biosynthesis. Indeed, evaluation of the expression of the fenC gene showed that the synthesis of fengycin was overexpressed at 12 h after bacterial inoculation, suggesting an early perception of a signal emitted by the fungus. We have therefore assumed that the lipopeptide-inducing molecule emitted by *R. variabilis* most likely corresponds to a soluble compound diffusing in the gelled medium because the stimulation of fengycin has not been observed by cultivating the bacterium and the fungus under same conditions in co-culture. A two-compartment test was then performed to detect the influence of volatile compounds emitted by the fungus on the production of fengycins. The results strongly suggested that the overproduction of fengycins by S499 is not related to the VOCs emitted by the fungus nor to the detection of molecular models sheltered on the cell surface since the two partners were not in physical contact. Globally, the molecular basis of the phenomenon with respect to the perception of fungi and downstream signal transduction leading to a synthesis of upregulated CLP in *Bacillus* is still completely unknown. Further investigations are still necessary.

CHAPTER 6. REDUCTION OF FUNGAL INFECTION OF MAIZE SEEDLINGS BY *BACILLUS* IN GROWTH CHAMBER EXPERIMENTS

6.1. INTRODUCTION

Based on their high potential for inhibition of pathogens and lipopeptide production on roots and seeds of corn, *B. amyloliquefaciens* S499 and QST713 were selected for further *in planta* biocontrol assays performed in growth chamber. First we tested the ability of the strains to reduce infection of maize seedlings caused by the four fungal pathogens at 20°C and 29°C using seeds germinated in moistened Petri plates. Further experiments were carried out in a culture chamber with seeds treated with the bacterium in soil contaminated with the pathogens. The objective was to confirm the results obtained *in vitro* (chap .4) and to correlate the profile of the antifungal molecules with *in planta* efficacy.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1. Biocontrol of pathogens by S499 on seeds and seedlings

In all experiments, seeds were disinfected in sodium hypochlorite and then washed extensively with sterile distilled water prior to use. Microbial inocula were prepared as follows. *B. amyloliquefaciens* S499 was cultured on 868 medium (yeast extract 16 g/l, casein peptone 10 g, glucose 20 g/l, agar 17g/l) at 25°C for 48 hours. A fresh colony culture was placed in 9 ml of peptone water (1 g/l Bactopeptone, 9 g/l NaCl, 0.02% Tween 80), and centrifuged at 4000 rpm during 20 min at 4°C. The supernatant was removed and the pellet re-suspended in peptone water and cell concentration was adjusted to 5.10^8 cells/ml. For the preparation of fungal inoculum, the pathogens were grown on PDA medium for 10 days. Spores were scrapped from the mycelium in peptone water and centrifuged at 3000 rpm. For pathogen inoculation, the seeds were soaked for 40 min in a fungal suspension at a concentration of $1.4.10^7$ spores/ml and at the same time in a bacterial solution with a concentration of 5.10^8 bacterial cells/ml. Treated seeds were placed in Petri dishes containing watered Whatman paper and incubated at 20°C or 29°C for 10 days. The efficacy of *Bacillus*

to control infection was determined using an arbitrary scale established according to the symptoms observed on the seeds, and on hypocotyl/roots of young seedlings. This scale is as follows: 4: total protection of seed and seedling, no symptoms of pathogen damages, 3: Intermediate protection, no damage to the seed or on hypocotyls and roots but few traces of spores on parts of the plant, no clear adverse effect on plant health, 2: serious damages on seeds/seedling due to obvious pathogen growth and infection and 1: dead seeds and/or total decay of the plant.

6.2.2. Biocontrol on young plants in growth chambers

These assays were performed on maize plants grown in potting soil (commercial soil DCM-ECOTERA with the following characteristics: 38% dry matter; 20% organic matter; pH 6.5; hydraulic conductivity $1,5\mu\text{S}/\text{cm}$; NPK: 7-7.5-8; $1.5\text{Kg}/\text{m}^3$) to the third-leaf stage at 25°C and 50% RH. Prior to sowing, sterilized seeds were inoculated with the bacterium as described above while the pathogens were introduced into the growth substrate by mixing 15 g of maize flour inoculated with 4.10^8 spores with 2 kg of potting soil. Both potting soil and maize flour were autoclaved prior to use. Mortality and typical symptoms on surviving plants were used as parameters to evaluate disease reduction according to the following arbitrary scale: 0: wilting and death of the entire plant, 1: 100% of the sheet exhibit symptoms but restricted to few basal leaves of the plant, 2: 50-75% of the sheet displays typical symptoms of the disease, 3: <25% of the leaves show symptoms of the disease, 4: <10% of the leave exhibit the symptoms of the disease and 5: No visible symptoms on plants.

6.3. RESULTS

6.3.1. Biocontrol activity on seeds and seedlings

Data presented in Fig. 6.1.A and 6.1.B show that seed pre-treatment with *Bacillus* strains (BCA) allowed to efficiently reduce disease incidence for all pathogens. At both temperatures, *Bacillus* inoculation afforded an almost full protection of seeds and seedlings while most of the untreated but infected controls displayed severe rotting or total decay of the seedlings (Fig. 6.2.).

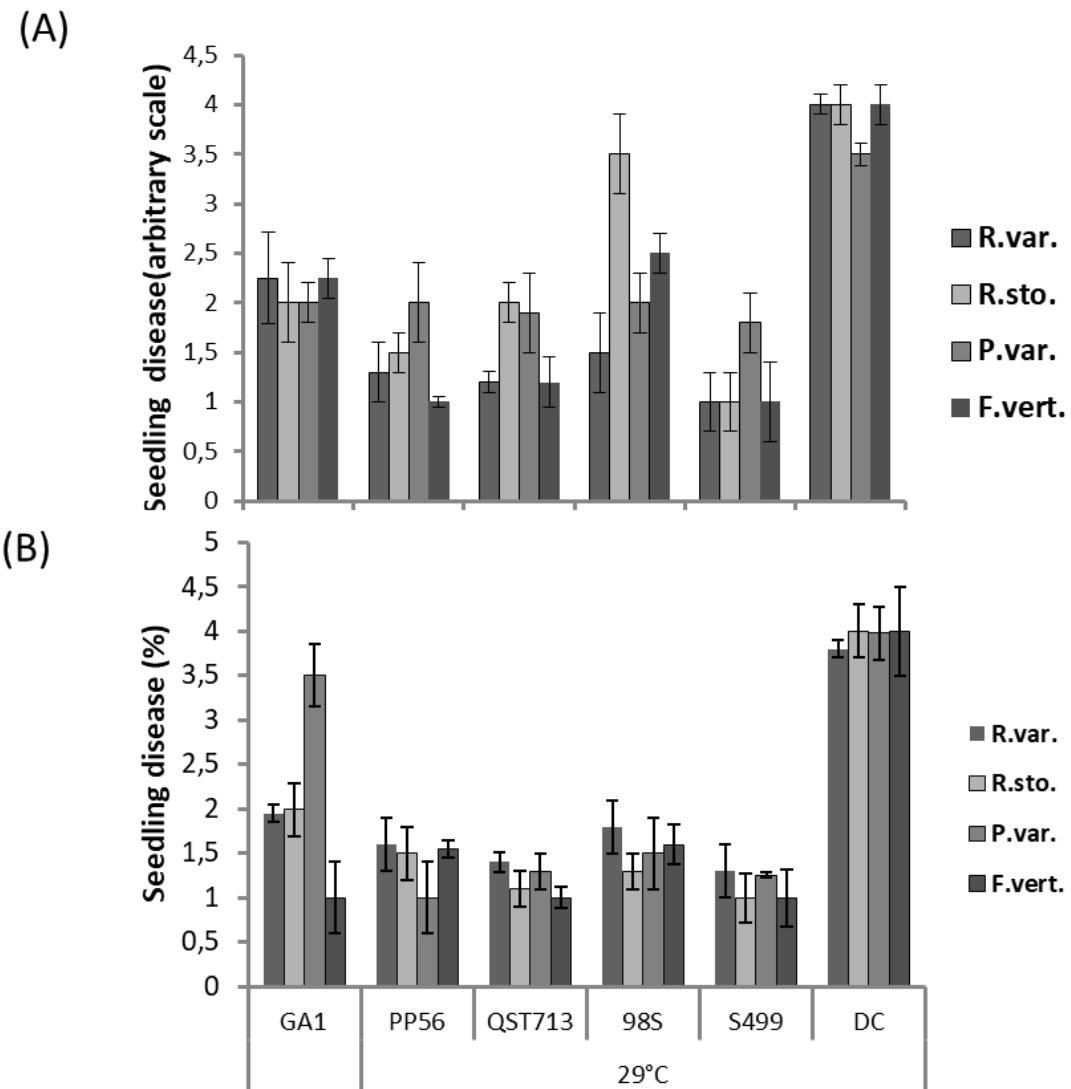


Fig.6.1: Reduction of fungal infection of maize seeds and seedlings upon treatment with *Bacillus subtilis*/*amyloliquefaciens* (strains GA1, QST713, 98S, S499) and *Paenibacillus polymyxa* (PP56) under controlled conditions. (A and B) Infection rate of seeds germinated in moistened Petri plates after inoculation with the four pathogens (F. ver., *Fusarium verticillioides*, R. Sto., *Rhizopus stolonifer*, P. Var., *Penicillium variabile* and *R. variabilis*) and treatment with *Bacillus* spp. compared to seeds infected but not treated with the bacterium (Disease Control, DC) at 20 and 29°C. The efficacy of *Bacillus* to control infection was determined by using an arbitrary scale that was established according to the symptoms observed on the seeds and on the hypocotyl/roots of young seedlings. See Materials and Methods for a description of disease rating scale used to quantify disease protection. 29°C compared to controls not treated with the bacteria. Incidence (%) of root diseases compared to controls not treated with the bacteria. Averages were obtained from five replicates per treatment and the experiment was repeated twice (n=10). Error bars represent the standard deviation at p< 0.05.(C).

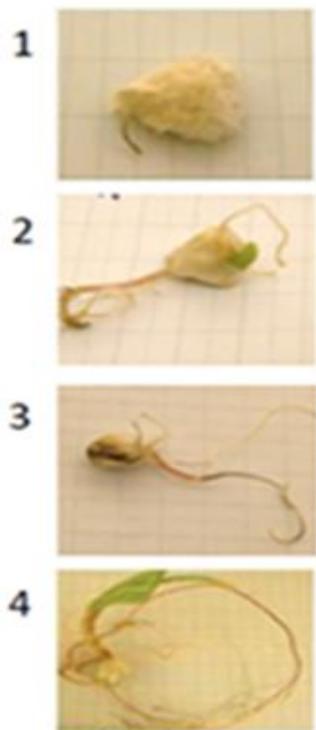


Fig.6.2: Exemple of Visualization of biocontrol effect provided by *B. amyloliquefaciens* against Pathogens. A, diseases symptoms observed on seeds and seedlings ranging from strong infection (1-2, as observed in disease controls only inoculated with *R. variabilis/F. verticilloides*) to full protection (4, as observed upon treatment with strain *Bacillus* strains).

After the evaluation of the inhibition of pathogens on seeds and seedlings, we continued the observations until the formation of the branched roots on seeds at 20 and 29°C. Data show that seed inoculation with biological control agents (BCAs) has reduced disease symptoms and root rot, but this protection varies with pathogens and biological control agents. With regard to the reduction of diseases on the seed roots, strain S499 completely reduced root rot at 29°C for all diseases tested, followed by QST713 which also completely reduced root rot caused by *R. variabilis*, *R. stolonifer* and almost totally root rot by *R. variabilis*. Strains 98S and PPP 56 also contributed significantly to the reduction of disease symptoms and root rot at all temperatures. The results are presented in figure 6.3 (A) and 6.3 (B).

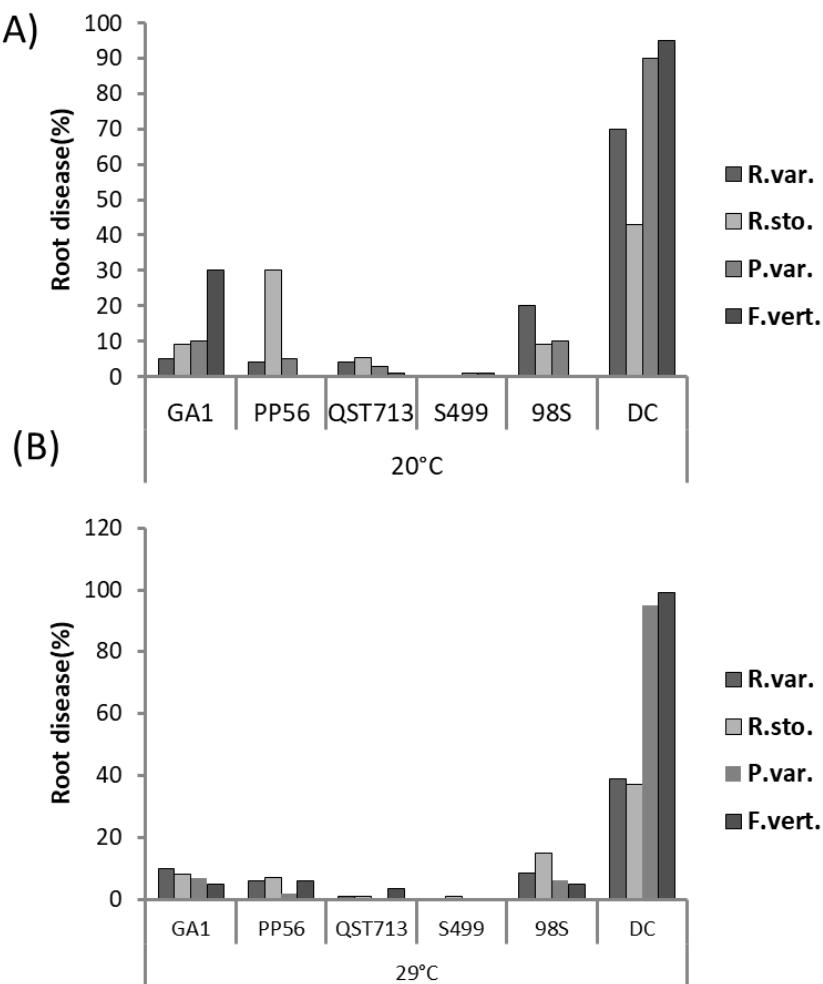


Fig.6.3. Reduction of fungal infection on maize roots and roots rot upon treatment with *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (strains GA1, QST713, 98S, S499) and *Paenibacillus polymyxa* (PP56) under controlled conditions. (A and B) seeds was germinated in moistened Petri plates after inoculation with the four pathogens (*F. ver.*, *Fusarium verticillioides*, *R. Sto.*, *Rhizopus stolonifer*, *P. Var.*, *Penicillium variabile* and *R. variabilis*) and treatment with *Bacillus* spp. compared to seeds infected but not treated with the bacterium (Disease Control, DC) at 20 and 29°C. Averages were obtained from five replicates per treatment and the experiment was repeated twice (n=10). Error bars represent the standard deviation at $p < 0.05$ (C).

6.3.2. *Bacillus S499 and QST713-mediated protection of seedlings and plantlets under lab conditions in growth chamber*

Bacillus strains QST713 and S499 were further tested for their ability to control pathogens and prevent from take-all and leaf infection using plants grown in infested potting soil to the third-leaf stage. The results showed that bacterial treatment reduced significantly not only the mortality rate (Fig.6.4.A) but also leaf infection (Fig.6.4.B) on maize plants compared to untreated controls with a high index of disease reduction ($P < 0.05$). The most sensitive pathogen to the effects of *B. amyloliquefaciens* S499 was *R. stolonifer*, *R. variabilis* and finally *F. verticillioides* concerning the diseases reduction on leaves. QST713 was also effective against most diseases, but it was significantly effective against *P. variabile*.

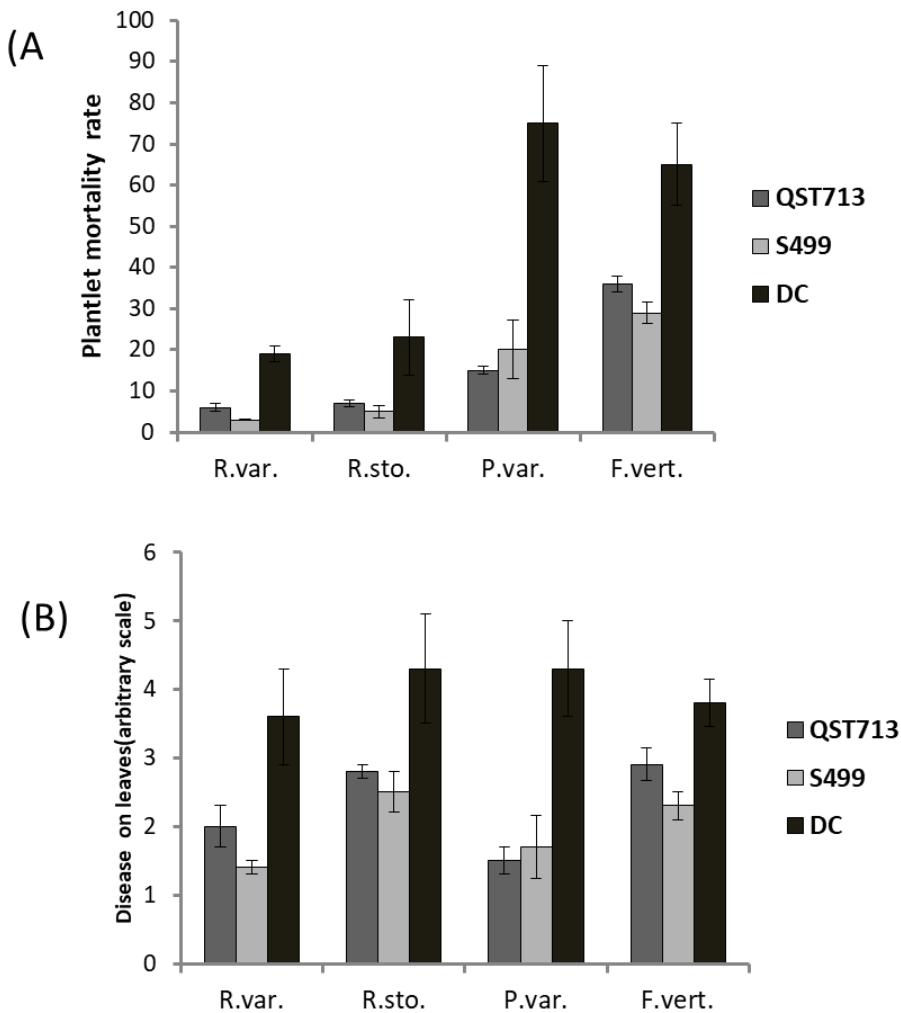


Fig.6.4. Reduction of fungal infection in growth chamber. The assays were performed on maize plants grown in potting soil to the four-leaf stage at 25°C and 50% relative humidity. Prior to sowing, seeds were inoculated with the bacterium as described above while the pathogens were introduced into the growth substrate by mixing 15 g of maize flour inoculated with 4.10^8 spores of pathogens with 2 kg of potting soil. Both potting soil and maize flour were autoclaved prior to use. Mortality (Fig.4A) and typical symptoms on surviving plants (Fig.4B) were used as parameters to evaluate disease reduction according to the following arbitrary scale: 0: wilting and death of the entire plant, 1: 100% of the sheet exhibit symptoms but only few basal leaves of the plant, the sheet has symptoms, 2: 50-75% of the sheet has the symptoms of the disease, 3: <25% of the leaves show symptoms of the disease, 4: <10% of the leave exhibit the symptoms of the disease and 5: No visible symptoms on plants. Averages were obtained from five replicates per treatment and the experiment was repeated twice ($n=10$). Error bars represent the standard deviation at $p< 0.05$.

All the two strains tested significantly reduced the mortality of the plants compared to the untreated control. This mortality was even more reduced with the treatment against *R. variabilis* and *R. stolonifer*. Interestingly, plant mortality and symptoms of *F. verticilloides* have been significantly reduced compared to untreated controls. *F. verticilloides* is considered an

important corn pathogen both in tropical and in the midst Tempered because of the losses of yield that it occasioone to the corn cobs, seeds, the seedlings and the deterioration of the harvest quality because of the production of the various mycotoxins. The most sensitive pathogen to the treatments with *B. amyloliquefaciens* S499 and QST713 was *R. stolonifer* followed by *P. variabile* and finally *F. verticilliooides*. These results confirm those obtained *in vitro* and demonstrate the efficacy of the bacteria on all pathogens.

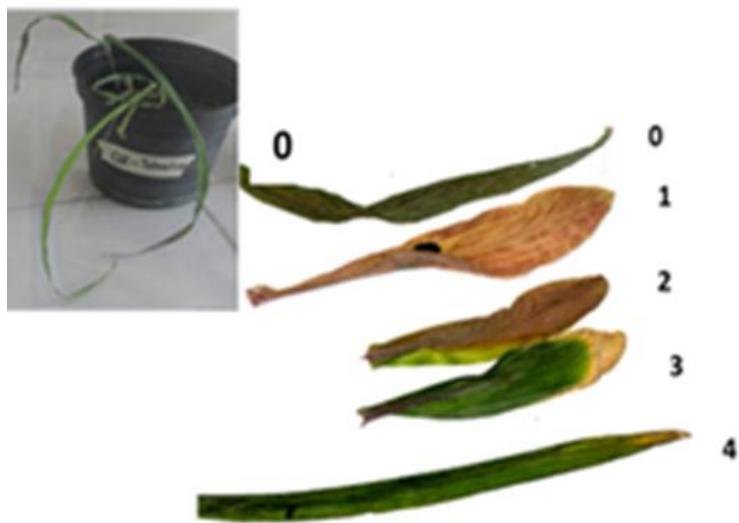


Fig.6.5: Leaf infection observed on plants grown in infested potting soil to the third-leaf stage and ranging from severe necrosis on the whole leaf area (1-2, as observed in disease controls only inoculated with Pathogens (*R. variabilis*, *R. stolonifer*, *R. variabilis*, *P. variabile* or *Fusarium*) to few visible symptoms (3-4, as observed upon treatment with strain S499 and QST713).

6.4. CONCLUSION

Seed innoculation with biological control agents is an appropriate method for suppressing plant pathogens in the spermosphere and rhizosphere (Pereira et al., 2007). In recent years, bacterial inoculants have been used to antagonize pathogens of soil plants such as *F. verticillooides* and to promote plant growth. *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas spp* were successfully used to control root rot caused by *F. verticillooides* in Argentina (Cavaglieri et al., 2005). Other studies have also shown that *Bacillus amyloliquefaciens* can stimulate plant growth and suppress *Fusarium* diseases on maize (Hernández-Rodríguez et al., 2008) and the accumulation of

fumonisin in corn. In this chapter we have demonstrated the ability of *Bacillus* to control pathogens of maize under controlled conditions after demonstrating its ability to inhibit pathogens in vitro in correlation with lipopeptides production involved in biocontrol of pathogens and root colonization in our previous studies. A collection of *Bacillus* strains was first tested for their ability to control pathogens on seeds germinating on a humidified petri dish and incubated at 20 and 29°C. The results show that seed treatment with *Bacillus spp* prevented rotting of seeds, seedlings in germination and root rot as compared to the untreated control. These results made it possible to select the strains S499 and QST713 for the continuation of the experiments on the potted plants in a soil contaminated by the pathogens. These results made it possible to select the strains S499 and QST713 for the continuation of the experiments on the potted plants in a soil contaminated by the pathogens. The results obtained have further demonstrated the potential of *Bacillus* QST713 and S499 to reduce plant mortality and hence the reduction of symptoms of leaf disease compared controls. Although both strains were effective, the S499 strain was even more effective than QST713 in reducing the incidence of diseases on plants. We have attributed this efficacy to the production of surfactin, fengycins and iturins which are lipopeptides involved in pathogen control according to several mechanisms. Indeed, in our previous experiments, this strain has demonstrated its ability to colonize roots of corn and produce on these roots a large quantity of surfactins which are inducers of the immune system of plants, fengycins and iturines directly involved in Fungitoxic activity. Interestingly, the semi-purified lipopeptides recovered from *Bacillus* grown on seed and root exudates showed their ability to inhibit all these pathogens at low concentrations of the order of μM . This suggests that the biological control of all pathogens by S499 in soil contaminated by pathogens is linked to the production in sufficient quantities of these antibiotics at the root surfaces.

CHAPTER 7. EFFICACY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* AS BIOCONTROL AGENT TO FIGHT FUNGAL DISEASES OF MAIZE UNDER TROPICAL CLIMATES IN SOUTH KIVU

7.1. INTRODUCTION

In the previous chapters we evaluated the potential of several *Bacillus amyloliquefaciens* strains in comparison with a strain of *P. polymixa* PP56 as biological control agents against some newly isolated endemic fungal pathogens infesting maize in Kivu in DR Congo, in order to contribute to search a solution to the problems of yield loss and the quality of the harvests caused by the latter to the cultivation in the field and in post-harvest. Four fungal pathogens isolated from corn cobs from two different agro-climatic and climatic zones in the Kivu were first characterized on the basis of morphological, pathogenicity and molecular characteristics by homology of the ITS sequences (see chap. 4). Strain S499 was selected from a range of other strains based on its high antagonist activity *in vitro* and *in planta* correlated with an enormous potential for secretion of fungitoxic lipopeptides. Under the rhizosphere conditions, these bacteria feed on root exudates. In order to correlate pathogen inhibition and lipopeptide production, strain S499 was first grown in the same exudate medium in liquid cultures at 20°C and 29°C. To further confirm the fungitoxic role of these *Bacillus* -produced lipopeptides on corn exudates, they were then semi-purified by solid phase extraction and further tested for inhibition of fungal growth as a mixture of surfactin / iturin / fengycin (relative proportions 51/32/17% by weight) at various concentrations between 5 and 160 µg / mL. It was also observed that the susceptibility of the pathogens to these lipopeptides varied according to the pathogen and the dose. Interestingly, it has also been shown that among the strains tested, the S499 strain is able to perceive the molecular signal emitted by certain pathogens and, following this perception, it modulates the overproduction of antifungal compounds. These results clearly confirmed our first hypothesis that pathogen inhibition is related to the production of lipopeptides and that *Bacillus* strains have the ability to produce these compounds to various antifungal effects when in contact with seeds and roots of corn.

On the basis of these results, we continued our large-scale in field experiments with strain S499 to confirm the interesting results obtained in laboratory conditions.

In this study, we wanted to evaluate the potential of *B. amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight some newly isolated endemic fungal pathogens infesting maize in South Kivu. The most active strain S499 has been selected from preliminary in vitro antagonism assays with the aim to further test its CLPs-dependent efficacy in controlling fungal diseases on plantlets in growth chamber and on plants grown under field conditions over an entire cropping period. We report here a strong beneficial effect of this strain evaluated at two different locations with specific agro-ecological conditions.

7.2. MATERIALS AND METHODS

7.2.1. *Characteristics of the two areas*

This study was conducted in two different agro-ecological zones of South Kivu in Eastern Democratic Republic of Congo which are Mudaka in Kabare region and Katogota in Ruzizi plain region. These two areas have different soil and climate characteristics. Mudaka has a humid tropical climate tempered by the high altitude with annual average temperature of 18°C-20°C whereas Katogota is characterized by a semi-arid climate with daily temperature varying from 23°C-32°C. Mudaka has a clay and very acid soil often poor in organic matter and for which a phosphorus intake is necessary for higher yields. At Katogota, the soil is sandy and fairly clay with low organic matter content and also low available phosphorus. Additional characteristics of the two areas are provided in Table 7. 1.

Table7.1. Soil, location and climate characteristics of the two areas used for field experiments.

Sites/Area	Mudaka	Katogota
Geographic coordinates and climate conditions		
Altitude	1610 m	782 m
Latitude	02.390098°S	02.5498°S
Longitude	028.79399°E	029.0245°E
Rainfall	1770 mm/Year	1000 mm/Year
Temperature	Mean: 20°C	Mean: 30°C
Relative humidity	81%	78%
Wind speed	3 km/h	7 km/h
Soil characteristics		
pH	4.5	5.64
Organic Carbon (%)	8.2	4.8
Nitrogen (%)	0.19	0.27
Available phosphorus : P (ppm)	7.35	13.69
C/N	10.09	17.78
CEC (meq/100g)	11.07	24.3
Zinc (ppm)	10.16	98.81
Iron (ppm)	307	150.54
Exchangeable potassium: K (cmol/kg)	0.53	0.39

7.2.2. Plant material and microbial inoculum preparation

The corn variety eckavel was used for field experiments. This variety is characterized by a plant height for insertion of the spike of 1m, 50% of the male flowers appear at the 57th day and 50% of female flowering at the 59th day after sowing. The 1000-seed weight is between 300-320 grams while kernel color is generally white. Agronomic characteristics are a crop cycle of 90-110 days with a yield of 1,5-3 tons ha⁻¹. The variety is grown between 800-1300 m. This variety is resistant to some diseases but susceptible to others such as leaf spot, rust and stem borer according to the National Seed Service, Democratic Republic of Congo. Seeds were surface sterilized by submerging in 3% sodium hypochlorite for 3 min and then in 75% ethanol for 2 min. The seeds were then rinsed in sterile water three times and placed on sterile filter papers to dry for 30 min before successive inoculations with pathogens and/or with the biological

control agent. Inoculated seeds were incubated for 30 minutes before sowing. The objective was to evaluate the effectiveness of *B. amyloliquefaciens* S499 to control pathogens throughout the entire plant growth cycle. The first observation was made from the germination to a stage of 3-4 leaves on young plants, a second rating was performed before flowering when the plants had reached the stage over 9 leaves and last observations were made during the maturity stage of the cobs.

For the preparation of the bacterial inoculum, cells were grown in the liquid medium "Brain-heart infusion" containing per liter 17.5 g peptone, 2.0 g sodium chloride and 2.5 g sodium phosphate, 2.5 g, pH 7.4 at 25°C. Cells were recovered by centrifugation and the optical density of the inoculum was adjusted to 1 which corresponds to approx. 10^8 cells per mL using a Gentuar-UV spectrophotometer.

For pathogen inoculum preparation, *Fusarium verticillioides*, *Rhizospo*s *stolonifer*, *R. variabilis* and *Pennicillium variable* were cultivated in Petri dishes on Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol (5 g enzyme casein hydrolyzate, 5 g pepsin digestive animal tissues, 40 g dextrose, 0.005 g chloramphenicol and 15 g agar in 1 liter of distilled water, pH 5.6) at 25°C during two weeks. Spores were recovered in peptone water by scraping the surface of the plates with a platinum loop and 4000 rpm for 5 minutes. Spore concentration was adjusted to 7.10^8 spores/mL by counting using the Mallassez cell.

7.2.3. Experimental design, infection, disease assessment

In both sites, field experiments were performed using a randomized complete block design with three blocks (or repeats) containing each 6 plots with specific treatments. Inter-block distance is of one meter and a distance of fifty centimeters were set between plots. So a basic plot was four meters wide and four meters long, thus an effective area of 16 m^2 . The spacing of 80x50 cm was adopted. A total of eight rows in length and five in width were set and two seeds were sown per hole, making a total of sixty plants per plot.

Five days after germination, strain S499 was again applied as soil drench in order to strengthen the effectiveness of the initial seed treatment and 10 mL of bacterial suspension (10^8 cells.mL⁻¹) were poured at the root collar around each young seedling. An additional application of the bacterium was performed during plant growth one month after germination by spraying 15 ml of S499 cell suspension on the leaves targeting sheets bearing the symptoms of the disease. We

also evaluated the S499 capacity to protect corn cobs after artificial infection. Two fungal inoculations of 2 ml (10^8 spores.mL⁻¹) were made, the first 7 days after silking and the second at the grain filling stage, in the center of each primary cob according to the procedure of Lana and Zhu (2005). 24 hours after this operation, a bacterial suspension (10⁸ bacterial cells.mL⁻¹) was injected into the same parts by the same procedure. S499 capacity to prevent seed rot and mortality of young seedlings was evaluated one month after planting. according to the formulas T (%): $(\text{NGG} / \text{NGP}) \times 100\%$ with NGG, the number of grains germinated and NGP, the total number of grains planted per plot. T (%), emergence rate in% and Z (%): $(\text{NGT} + / \text{NGP}) \times 100\%$ with NGT: number of seeds that have not managed, NT: seedlings germinated but dead, NGP: Total number of planted seeds. In order to evaluate the protective effect of S499 on the leaves during the growth phase, we have measured the symptoms of the disease in terms of severity by counting lesions extending significantly and by measuring their size. The disease reduction index was calculated according to the formula: $I = (A-B) \times 100$ with A: size of lesion on the leaves in the control and B: size of lesions in plots treated by S499. For cobs, the assessment was made at the usual harvest time or when the grain moisture content was 24%. Cobs disease severity was evaluated using a scale based on the percentage of kernels with visible symptoms of infection such as rot and mycelial growth or visually by the percentage of the surface of the cobs (Fig.7.1) which is infected according to Lana and Zhu (2005).

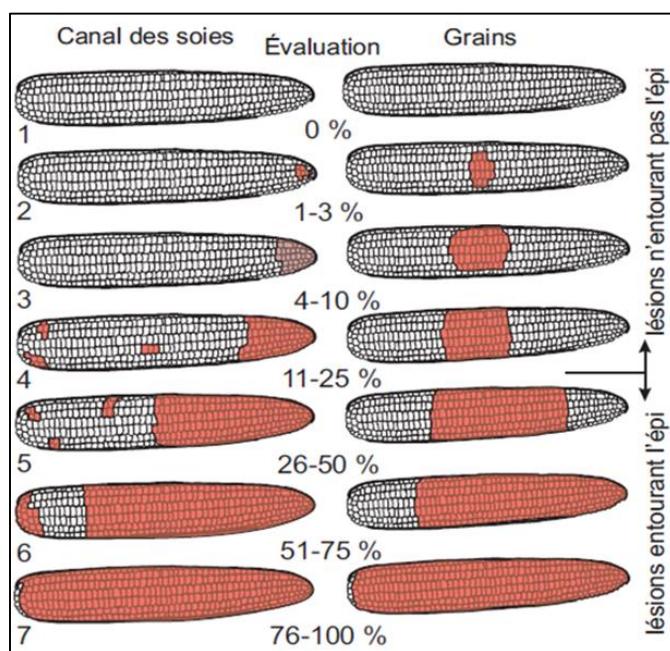


Fig.7.1. Scale of lanna used for disease assessment on corn cobs

7.3. RESULTS

7.3.1. Biocontrol provided by S499 in field trials

In order to evaluate the efficacy of strain S499 as biocontrol agent under agronomic conditions, field experiments were performed in two different agro-ecological zones of South Kivu over the entire growth cycle of maize (February-June 2015). The site of Mudaka is located in high altitude with a tempered humid tropical climate with average temperature of 20°C while the Katogata site is in plain with semi-arid climate and daily temperature raising to 30-32°C. Details on eco-petrological data for the two locations are given in Table 7.1. Trials were set up in a randomized complete block design using sixty plants per plot (3 plots per treatment) in order to evaluate protection efficacy against *R. stolonifer*, *P. variabile* and *F. verticillioides* which may cause damages from planting to maturity of the plants. The pathogens were thus artificially inoculated by immersing maize seeds in conidial suspensions and these infected seeds were then sprayed with the bacterium before sowing.

The ability of S499 to protect seedlings was assessed two weeks after plant emergence based on the rate of germination (Fig.7.2A) and on mortality percentage (Fig.7. 2B) in treated plots compared to plots containing untreated but infected plants (disease controls, DC) and non-inoculated plants (controls, C). The three pathogens had relatively low incidence on seedling emergence in these conditions since up to 70-80% germination rate was observed in all DC. However, even if not statistically significant, treatment of seeds with S499 allowed to increase germination rate at the Katogata site from 70-75% for pathogen infected plants to 82-95%. Such protective effect was less obvious at Mudaka except for *F. verticillioides* infected seedlings. The number of dead plants during this early growth stage was globally higher at Katogata but at both locations, bacterial treatment was associated with a decrease in mortality rate of 5-30% according to the pathogen with highest efficiency against *R. stolonifer* and *F. verticillioides* (Fig. 7.2.B).

Aerial parts of plants that survived this early growth phase were sprayed every 30 days with the bacterium until three months after sowing. Disease severity based on the size of typical symptomatic lesions caused by each pathogen was assessed before flowering when the plants had reached the stage of 9 leaves. Symptoms and damage observed are similar to those described for these pathogens on corn and other crops by many authors (Kwon et al., 2001; Yildirim et al., 2010; Sweets and Wright, 2008). Results presented in Fig.7.2C showed that

S499-treated plants were significantly less infected compared to DC in plots contaminated by the three pathogens. There was a highly significant reduction of disease symptoms at the two locations leading to a reduction in disease severity of 50-53% in plants infected by *Rhizopus*, 80-85% by *R. variabilis* and 60-66% in plants attacked by *Penicillium*. In the case of *Fusarium*, there was a significant difference between the two agro-ecological zones. S499 effectiveness of controlling this pathogen was observed in both areas but protection was lower at Katogota in low altitude (39% disease reduction) compared to Mudaka in high altitude (67% disease reduction) (Fig. 7.2.C).

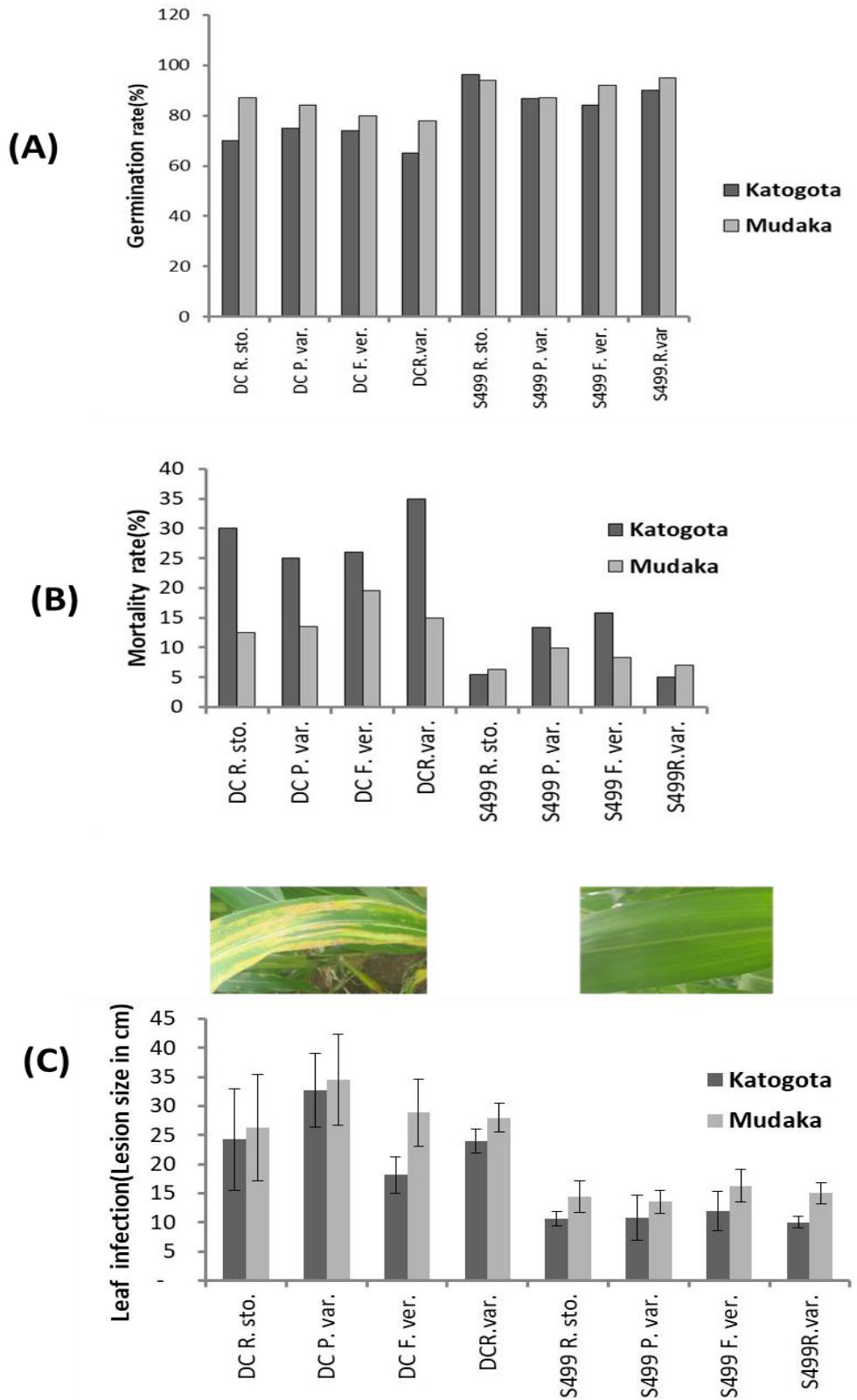
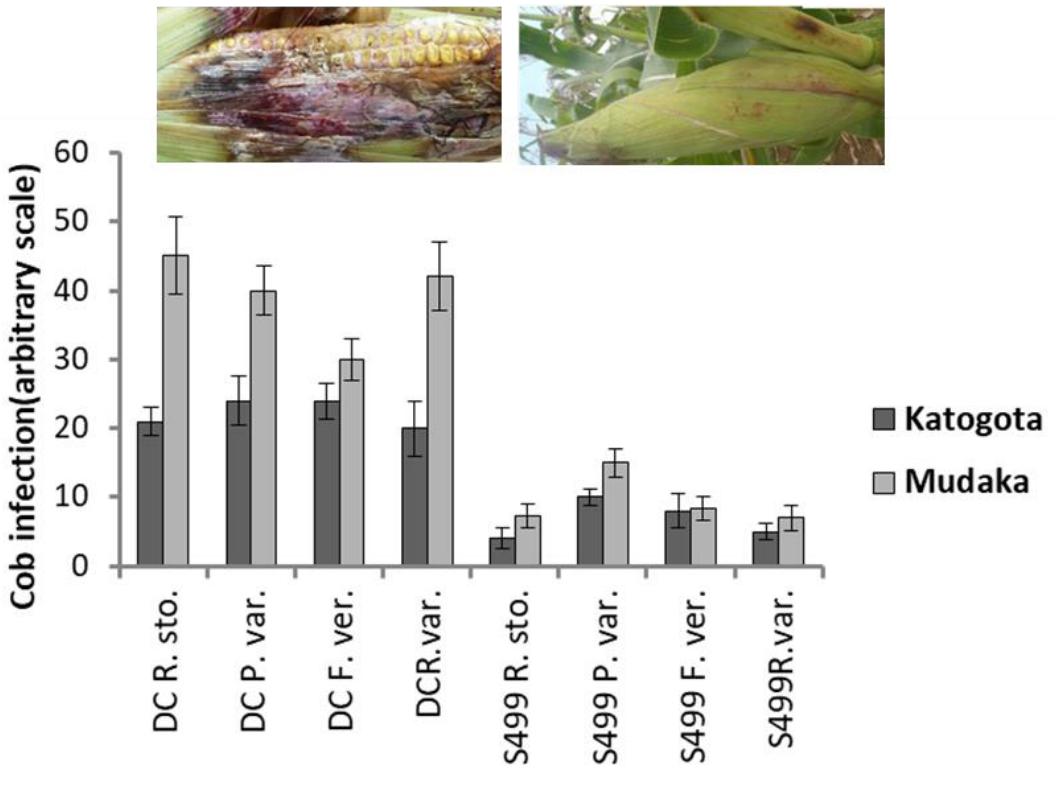


Fig. 7.2. Protection of maize by S499 under field conditions. (A, B) Beneficial effect of bacterial treatment evaluated one month after planting regarding seedling emergence (A) and decrease in plant mortality (B) caused by the three pathogens (*F. ver.*, *Fusarium verticillioides*, *R. Sto.*, *Rhizopus stolonifer* and *P. Var.*, *Penicillium variabile*, *R. variabilis*) artificially inoculated as described in the materials and Methods section. Data from plants treated with S499 are compared to disease controls (DC). (C) Protective effect of S499 against infection on leaves during the growth phase. Disease

symptoms were evaluated by counting and measuring typical lesions caused by each pathogen (as illustrated for *F. verticillioides*) before flowering when the plants had reached the stage of 9 leaves. (D) Protective effect of S499 against infection of cobs following artificial inoculation of both pathogens and the biocontrol bacterium on primary silks at maturity stage. The assessment of disease impact on cobs was then performed at the usual harvest time or when the grain moisture content was 24%. Cobs disease severity was evaluated using a scale based on the percentage of kernels with visible symptoms of infection (illustrated for *R. stolifer*) such as rot and mycelial growth or visually by the percentage of the surface of the cobs which is infected. In all instances, mean values and s.d. were calculated from 60 plants per elementary plots and three plots were used for each treatment in an experiment conducted in a randomized block design in the two agro-ecological zones of South Kivu mentioned.

Additional observations were made during the maturity stage of the cobs after re-inoculation in primary silks of both pathogens and the biological control agent (24h later). The objective was to evaluate S499 ability to protect seeds and cobs at full maturity of seeds by ensuring sufficient disease severity levels in cobs of DC plants. The virulence of pathogens (especially *Rhizopus* and *Penicillium*) at infecting cobs was higher in Mudaka than at the Katogota site but *Bacillus* application clearly allowed to reduce the harmful effects of the four fungi to a similar extent at both locations (Fig. 7.3). In average, damages on cobs were reduced by 84%, 61% and 69% in plants treated by S499 and infected by *Rhizopus*, *Penicillium* and *Fusarium* respectively compared to the corresponding DC plots. Biocontrol efficacy of S499 was thus observed at all growth stages of the crop regarding both the incidence on seedling mortality, on leaf infection and on cob disease.



2.

Fig.7.3. Protective effect of S499 against infection of cobs following artificial inoculation of both pathogens and the biocontrol bacterium on primary silks at maturity stage. The assessment of disease impact on cobs was then performed at the usual harvest time or when the grain moisture content was 24%. Cobs disease severity was evaluated using a scale based on the percentage of kernels with visible symptoms of infection (illustrated for *R.stolifer*) such as rot and mycelial growth or visually by the percentage of the surface of the cobs which is infected. In all instances, mean values and s.d. were calculated from 60 plants per elementary plots and three plots were used for each treatment in an experiment conducted in a randomized block design in the two agro-ecological zones of South Kivu mentioned.

Positive effect of S499 on crop size and grain yield

At the end of experiments, several plant growth parameters were measured. First concerning plant height and root length, mean values were significantly higher in plots treated with S499 compared to those containing the corresponding DC plants at the Katogota site (Table 7.2.). A similar tendency was observed at Mudaka even if a statistically significant difference was not obtained for root length of plants infected with *Penicillium*. We have also evaluated the improvement in crop yields provided by S499 application. Most plants (S499 treated and DC) produced two cobs with a similar number of rows (data not shown). However, the filling rate of the cobs and the total number of grains per plant were globally enhanced in plants treated with the bacterium compared to DC to reach levels similar to non-infected plants significantly

even if not always statistically significant considering the three pathogens and regarding location (Table 7.2). It is therefore clear from these results that both plant size and grain yield parameters were higher in treated plots compared to control plots without bacterial treatment. This is reflected by the higher global yield (t/ha) presented in Fig. 7.4.

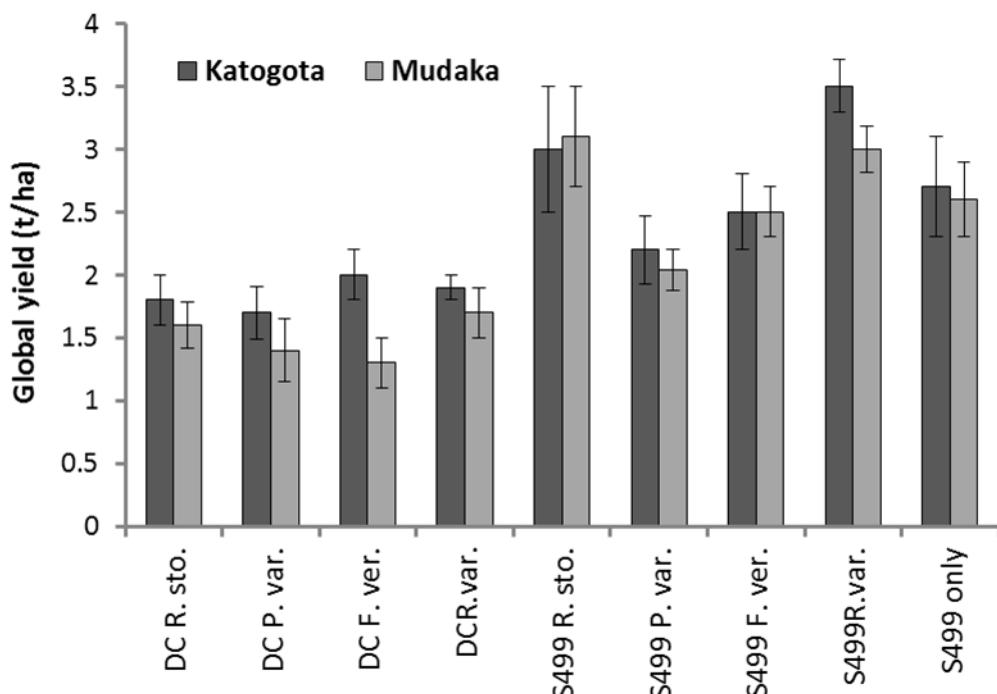


Fig. 7.4. Positive impact of S499 treatment on global yield maize grain production in field experiments at both locations. Yield parameters observed were as described in Table 7. 2.

Table 7.2. Beneficial effect of *B. amyloliquefaciens* S499 on maize yield and growth parameters

Treatment	Nb of grains/plant	Lenght of cobs	Filling rate of cobs (%)	Plant height (cm)	Leaf area (cm ²)	Root lengt (cm)
Katogota						
S499+R. Sto.	401a	15a	86a	221a	866a	17a
S499+P. Var.	305b	13b	88a	213ab	780a	19a
S499+F. ver.	307b	15a	68b	237a	781a	16a
S499+R.. var.	401a	15a	86a	239a	782a	17a
DC R. Sto.	173c	11c	65b	197c	750ab	12b
DC P. Var.	235d	13b	68b	168d	584c	14b
DC F. ver.	247d	13b	78ab	166d	667b	14b
DC+R. var.	248d	14a	79ab	198c	668b	15b
S499 only	372a	15a	86a	194c	821a	14b
Mudaka						
S499+R. Sto.	260a	14a	72a	193a	866a	19a
S499+P. Var.	201b	14a	71a	130b	780b	16a
S499+F. ver.	222b	14a	60b	122b	781b	17a
S499+R.. var.	262a	14a	72a	193a	865a	19a
DC R. Sto.	117e	10b	84a	83c	610c	12b
DC P. Var.	92e	8c	50c	115cb	750bc	21a
DC F. ver.	132c	11ab	37c	104d	584e	12b
DC+R. var.	133a	12ab	28c	114cb	751bc	18a
S499 only	245a	13a	69a	195a	802a	19a

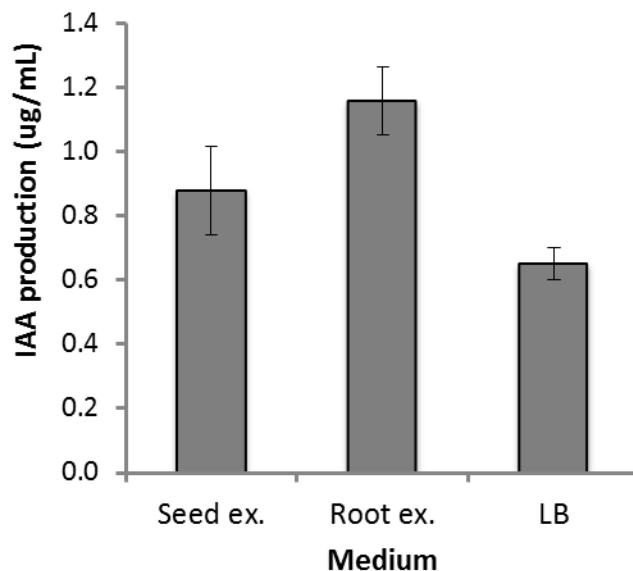
Table 7.2. Beneficial effect of *B. amyloliquefaciens* S499 on maize yield and growth parameters under field conditions. The mean of the same column followed by the same letter are not significantly different at P < 0.05 according the LSD test. For yield parameters, mean values were calculated from 50 maize cobs while for growth parameters mean were calculated from 60 plants per elementary plots. DC, disease controls corresponding to plants infected with the pathogen indicated but not treated with the bacterium. *F. ver.*, *Fusarium verticillioides*, *R. Sto.*, *Rhizopus stolonifer*, *R. variabilis* and *P. Var.*, *Penicillium variabile*.

Our results also showed that this global yield varied depending on treatments ($p= 0.019$) and sites. The highest yield increases were observed at Mudaka with 76%, 37% and 83% for biocontrol of *Rhizopus*, *Penicillium* and *Fusarium* respectively compared to 46%, 24% and 17% at Katogota site. At Mudaka, S499 treatment had contributed to increasing yield by up to 83% when applied to seeds and sprayed on the leaves of plants infected with *F. verticillioides*. This correlates quite well with the high reduction of pathogen impact by S499 observed at this location in terms of mortality and leaf/cob diseases (Fig. 7.2 and 7.3).

By contrast, the lowest yield improvement provided by S499 is also with this pathogen but in trials performed at Katogota which is also in agreement with a lower effect of S499 treatment on the various disease parameters. Beside location, biocontrol efficacy also varied with the pathogen considered as disease caused by *Penicillium* was globally less efficiently controlled by S499 than the one caused by *Rhizopus*. As a result, global yield increases upon S499 treatment of plants infected by the latest were doubled compared to those attacked by *Penicillium*.

The recent sequencing of the full genome of strain S499 revealed the presence of multiple genes involved in root colonisation, and biocontrol (antimicrobials) but also in plant growth promotion such as *dhaS* and *ysnE* for synthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid and *phy* coding for phytase, an enzyme that may contribute to phosphate solubilization and therefore phosphorus assimilation (Molinatto et al. 2016). The ability of S499 to produce indole-3-acetic acid upon growth on seed and root exudates and to mobilize phosphorus in the two types of soils was thus evaluated. As shown in Fig. 7.5A, the bacterium efficiently produces IAA on both types of exudates compared to LB medium even if roots products were more conducive than those released by the seeds. S499 also displayed some phosphorus solubilization activity (Fig.7.5 B) even if it varied significantly from one site to another ($p <0.01$).

(A)^o



(B)

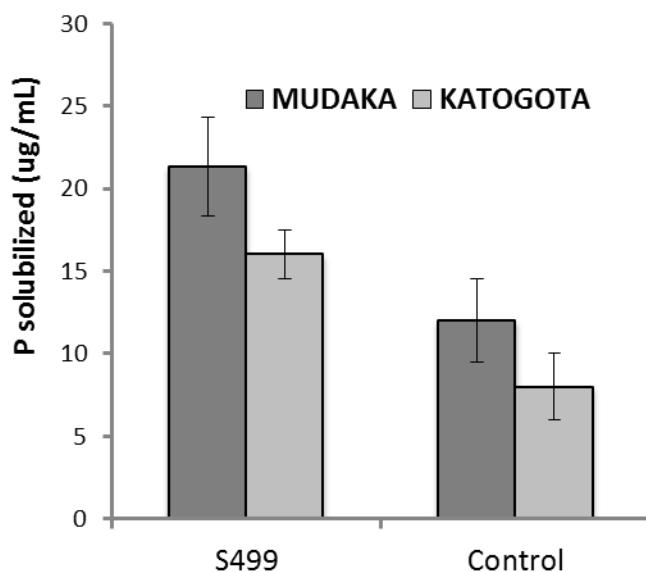


Fig. 7.5 (A) Production of indole-3-acetic acid (IAA) by strain S499 upon in vitro growth in three different liquid media (Luria-Bertani LB, seed and root exudates) and (B) phosphorus mobilization activity estimated colorimetrically by measuring solubilized P from soil samples representative of the two locations used for field experiments. Data are compared to controls representing the same soil matrix not submitted to incubation in the presence of the bacterium. In all cases, data are means and s.d. calculated from four repeats (n=4).

7.4. CONCLUSIONS

This work demonstrates the potential of *B. amyloliquefaciens* strain S499 as microbial biocontrol product to reduce diseases caused by endemic fungi on maize cultivated in DR of Congo. From a more global viewpoint, this work also provides a good example of successful bridging from lab-scale experiments to field application for the implementation of plant beneficial microorganisms as biocontrol products. Our data show for the first time that a particular strain of the well-known *B. amyloliquefaciens* species may be efficiently applied as biological control agent for reducing the impact of fungal infection of maize in the field under the ecological conditions prevailing in South Kivu. It supports the hope of exploiting such technologically advantageous bacilli (Pérez-Garcia et al. 2011; Borrius 2011; Wu et al. 2015; Ravensberg 2015) for the sake of sustainable local production of this important crop in that area which is, as many others regions in central Africa, experiencing huge problems of plant diseases. As this beneficial effect was observed in two different locations, it suggests that the use of this bacterium can probably be extended to other regions of central Africa with similar tropical climate. Such implementation of microbial biocontrol agents in those area is even more important considering a socio-economic context where many farmers do not have access to conventional pesticides because these products are just not available or too expensive and are not well informed on the appropriate and safe use of these harmful chemicals.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 8. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces dernières années, la protection biologique connaît un regain d'intérêt alimenté par le souci croissant d'une meilleure protection de l'environnement, la préservation de la santé des utilisateurs et par le désir de la qualité des produits imposés par les consommateurs. L'utilisation d'agents de lutte biologique est devenue une réalité en agriculture pour réduire les dégâts et les pertes occasionnées par les maladies des plantes avec l'emploi en particulier des microorganismes antagonistes. Durant cette décennie, les inoculants bactériens ont été largement utilisés avec succès comme méthode alternative pour antagoniser les agents pathogènes sur les semences et sur les feuilles, les maladies du sol et favoriser la croissance des plantes pour améliorer le rendement et la qualité des récoltes (Pereira et al., 2007). Malheureusement / Conséquemment, le marché des biopesticides microbiens est encore fragile et non éprouvé. Il devient donc important de le stimuler et de l'alimenter à l'aide de données scientifiques rigoureuses propres à favoriser la confiance des éventuels utilisateurs. Il apparaît donc clairement que la problématique actuelle réside à la fois dans la découverte des nouveaux agents de lutte biologique, mais également dans le développement et la mise en marché des produits ou des organismes pour lesquels la recherche scientifique a déjà fait état du potentiel prometteur.

Les biopesticides microbiens sont nécessaires pour solutionner les problèmes et fournir une alternative aux produits chimiques en cultures ornementales en serre et en champ. Ce dernier secteur est une cible privilégiée des chercheurs et des compagnies œuvrant au développement de biopesticides à cause des superficies occupées par ces cultures, les quantités de pesticides utilisés, les risques pour l'environnement et des considérations économiques liés à l'ampleur du marché, justifient l'intérêt grandissant pour les cultures en champ. Dans ce contexte sur le plan appliqué, les travaux de recherche menés dans cette étude se placent dans le contexte du développement des produits biologiques à base des microorganismes utilisables comme biopesticides sur les grandes cultures et en choisissant le maïs comme plante modèle dans le milieu tropical subsaharien (cfr objectifs). Des grandes avancées ont été faites dans la connaissance de la biologie de ces microorganismes antagonistes et de leurs modes d'action pour lutter contre les agents pathogènes. Mais de nombreuses difficultés subsistent encore, en particulier concernant la régularité de leur efficacité en condition de culture naturelle où les

facteurs environnementaux sont fluctuants. Dans ce contexte les expériences ont été menées sur le terrain pour confirmer les résultats obtenus au laboratoire où les conditions sont contrôlées. Sur le plan fondamental, malgré les efforts faites en écologie, en biochimie, en physiologie microbienne et les progrès en biologie moléculaire, on connaît encore peu des choses sur l'interaction moléculaire entre un agent pathogène et un agent de lutte biologique en ce qui concerne la modulation de la production des métabolites/molécules actifs impliqué(e)s dans le contrôle des pathogènes du sol ainsi que les gènes impliqués dans leurs biosynthèses, un phénomène assez complexe et variable dans les conditions naturelles de la rhizosphère selon le patho-système. Une récente littérature qui s'est intéressée à la communication entre microorganismes dans la rhizosphère vient de confirmer que bien que les communautés microbiennes associées aux racines ont fait l'objet de nombreuses recherches, les facteurs et les interactions multipartites qui peuvent entraîner des changements dans la structure des microbiomes des racines et, par conséquent, affecter la santé et le développement des plantes, sont très complexes, dynamiques et mals connus (Lareen et al., 2016). La plupart des isolats appartenant au genre *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* ont le potentiel de produire une vaste gamme de composés antimicrob qui contribuent largement à leur efficacité en tant qu'agents de lutte biologique contre de nombreux agents pathogènes fongiques végétaux. Les rôle des lipopeptides cycliques (CLP) a été bien documenté, mais on connaît encore peu l'impact des interactions avec d'autres microbes habitant le sol sur l'expression de ces molécules comme ennoncée dans les objectifs. Grâce à cette étude, nous avons voulu donc comprendre si *B. amyloliquefaciens* en tant qu'agent de contrôle biologique est en mesure de percevoir le signal moléculaire émis par un pathogènes et que suite à cette perception il peut moduler la surproduction des lipopeptides antifongiques en relation avec les gènes impliqués dans leurs biosynthèse.

8.1. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PATHOGENES

Dans la première phase de cette thèse, nous avons isolé et caractérisé plusieurs souches fongiques responsables d'effets délétères sur les épis en champs ou en stocks causés par des champignons phytopathogènes sur le maïs entant que céréale la plus consommée en Afrique subsaharienne et en RD Congo, et ce dans deux zones agro-écologiques du Sud –Kivu bien distinctes, caractérisées par des conditions climatiques et pédo-environnementales différentes.

Quatre isolats phytopathogènes fongiques reconnus comme responsables des maladies, de pertes de rendement et de la qualité des récoltes par les agriculteurs locaux du Sud Kivu ont été isolés sur les épis de maïs malades et identifiés selon les observations morphologiques et moléculaire par homologie des séquences ITS. Il s'agit de *Fusarium verticillioides*, *Rhizospus stolonifer* et *Pennicillium variabile* et de *Rhuzomucor variabilis*, un pathogène endémique de la région. Ensuite nous avons réalisé des tests de pathogénicité pour vérifier les symptômes et les dommages qu'ils causent aux semences et aux jeunes plantules de maïs *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que ces pathogènes occasionnent les pourritures des graines / semences, des racines, réduit la germination et par conséquent la croissance des plantules comme on l'avait déjà aussi observé ailleurs par Debnath (2012), infectant les semences de blé (Kachuei et al., 2007, Levic et al., 2013) et dans la région des Grands lacs d'Afrique centrale sur une diversité des cultures vivrières. Les mêmes auteurs soulignent encore que ces organismes peuvent infecter d'autres cultures que le maïs et ont la capacité de survivre sur la semence de maïs ou à l'intérieur de celle-ci ou soit très facilement sur ou dans le sol ou sur les débris végétaux et s'y maintenir pendant plusieurs années sous forme de spores, zygosporès ou de mycélium (Buyckx ,1962, Autrique et Perreaux, 1983). En ce qui concerne spécialement *R. variabilis*, à notre connaissance, ce champignon n'a pas été précédemment décrit comme un agent infectieux attaquant le maïs, mais il a été associé à d'autres maladies du sol infectant les racines et les denrées stockées, comme c'est le cas des *Citrus spp* (Al-Sadi et al., 2014).

8.2. SELECTION *IN VITRO* DES *BACILLUS* POUR LEURS ACTIVITES ANTAGONISTE EN RELATION AVEC LA PRODUCTION DES LIPOPEPTIDES (CLPS)

La première sélection *in vitro* de *Bacillus spp* pour leur capacité d'inhiber la croissance des pathogènes a été réalisée sur PDA en utilisant les souches : *Bacillus amyloliquefaciens* (GA1 (Arguelles-Arias et al. 2014), QST713 (souche commerciale de Bayer Crop Science), 98S (Cawoy et al. 2014 et *Paenibacillus polymyxa* PP56 isolats (Debois et al., 2013). Ces souches ont été sélectionnées en fonction de leur production des lipopeptides et de leur activité de biocotrôle reportés dans des études antérieures par d'autres auteurs (Arguelles-Arias et al. 2014, Debois et al., 2013). Les résultats obtenus sur base d'antagonisme après confrontation directe avec les pathogènes ont montré que toutes les souches ont inhibé tous les pathogènes mais pas

avec la même efficacité. Les souches QST713 et S499 apparaissaient comme les meilleurs antagonistes contre la plupart des agents pathogènes alors que *P. polymyxa* PP56 n'a montré une inhibition significative que contre des pathogènes à croissance lente tels que *P. variabile*. Dans les conditions naturelles, de telles bactéries sont associées aux plantes et se nourrissent exclusivement des composés contenus dans les exsudats des racines (acides aminés, organiques, sucres, etc.) pour assurer leur croissance / survie et par conséquent produire des métabolites secondaires / antibiotiques ou soit des enzymes impliquées directement ou indirectement dans le contrôle biologique des maladies des plantes selon plusieurs mécanismes d'action (Campbell et Greaves, 1990, Nihorimbere et al., 2009, Nan Zhang et al., 2016). C'est ainsi que les cinq souches ont été ensuite testées pour leur activité antifongique sur un milieu minéral gélifié additionné d'exsudats de maïs (collectés à partir des racines des plantules de maïs semées en conditions gnotobiotiques ou des graines) entant qu'uniques sources de carbone et d'azote. Une tendance similaire à celle initiale sur PDA a été observée avec tous les isolats bactériens, mais la souche S499 et la QST713 se sont encore distinguées des autres en se montrant plus efficace avec une grande inhibition des pathogènes ciblés. Afin de corrérer l'inhibition des pathogènes avec la production de composés antifongiques, toutes les souches de *Bacillus* utilisées dans cette étude ont été cultivées dans le même milieu à base d'exsudats dans des cultures liquides à 20 ° C et 29 ° C. L'analyse des surnageants issus de ces cultures par UPLC-MS a révélé une sécrétion importante des trois principales familles des lipopeptides (CLPs) et leurs homologues impliqués dans le biocotrôle, à savoir les surfactines, les iturines et les fengycines aux deux températures correspondantes à celles des milieux d'origine des pathogènes (Chap.3). Dans ce contexte nutritionnel spécifique, même si des légères variations dans les proportions relatives entre les 3 types de CLPs ont été observées, les surfactines produites contenaient 12 à 16 atomes de carbone dans leur chaîne d'acides gras, les iturines A / mycosubtiline (homologues C14, C15 et C16) et les fengycines (homologues C14-C18) dont les A et les B qui diffèrent entre elles par la substitution d'un résidu d'alanine par la valine dans leur chaîne peptidique (Nihorimbere et al., 2012, Debois et al., 2014) sont les variantes qui ont été identifiées. A partir des résultats obtenus en fonction de la production des lipopeptides et de l'inhibition des pathogènes les souches QST713 et S499 ont été sélectionnées. Les lipopeptides produits par ces deux souches ont été semi-purifiés par extraction en phase solide et testés en outre pour l'inhibition de la croissance fongique (sporulation) sous forme d'un mélange de surfactines / iturines/ fengycines (proportions relatives de 51/32/17% en poids) à diverses concentrations comprises entre 5 et 160 µg / mL. Il a été observé également que la sensibilité des pathogènes à ces lipopeptides

variait selon le pathogène ciblé et la dose. *Fusarium verticillioides* a été clairement la cible la plus sensible avec une diminution marquée de la performance de croissance en présence de 10 µg / ml de cLPS à une IC₅₀ d'environ 30 µg / ml. L'inhibition significative du développement de *R. stolonifer* et *P. variabile* a nécessité au moins une addition de cLPs de 40 ug / ml pour une CI₅₀ d'environ 80 ug / ml. La forte inhibition des pathogènes par ces lipopeptides est lié à leur diverses actions fongitoxiques (cfr section suivantes) *in vitro* sur exsudats de maïs gélifiés (chap3 et Chap.4). En effet, les surfactines, les fengycines et les iturines ont été les seuls composés détectés en quantités significatives dans des extraits préparés et analysés par UPLC-MS après une extraction solide-liquide. Une telle activité antifongique des lipopeptides cycliques et plus particulièrement ceux appartenant aux familles des fengycines et des iturines avait déjà été illustrée par plusieurs chercheurs sur une large gamme de cibles fongiques telles que *Colletotrichum demiatium* (Hiradate et al., 2002), *Penicillium roqueforti* (Chitarra et al., 2003), *Aspergillus flavus* (Moyné et al., 2001), *Rhizoctonia solani* (Yu et al., 2002), *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* (Yáñez-Mendizábal et al., 2011), *Podosphaera* et les champignons nématifuges pour les iturines (Romero et al., 2007), *Botrytis cinerea* et diverses espèces de *Fusarium*, *Fusarium graminearum*, (Wang et al., 2007,Hanene et al., 2012), *Gibberella zae* (Liu et al.,2005) pour les fengycines et ,la combinaison des Surfactines/Fengycines /Iturines sur *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* et *Sclerotium rolfsii* (Alvarez et al., 2012), *Sclerotinia sclerotiorum* pour la combinaison des Surfactines/Fengycines (Alvarez, 2012, Khem Raj Meena and Shamsher Singh Kanwar, 2015). Nos données suggèrent fortement qu'une telle fongotoxicité des CLPs de *Bacillus S499* peut aussi être étendue aux souches pathogènes de *Fusarium verticillioides*, *Rhizospus stolonifer* et *Pennicillium variabile* (chap3) et *Rhuzomucor variabilis* (chap 4) pour résoudre les problèmes associés à ces pathogènes sur la culture du maïs dans le Kivu en RD Congo et peut être étendu aux pathogènes d'autres cultures pour réduire les pertes de rendement occasionnées par ces derniers et contribuer ainsi à la sécurité alimentaire dans la région. Après avoir observé l'inhibition des pathogènes par les trois principales familles de lipopeptides sur cultures faites sur exsudats liquide, nous avons fait d'autres tests par confrontation directe entre les pathogènes et les agents de lutte biologique sur milieu à base d'exsudats gélifiés prélevées sur des plantes de 20 jours cultivées en conditions gnobiotiques dans l'objectif de quantifier *in planta* l'accumulation différentielle des lipopeptides dans la zone d'inhibition. Une zone d'inhibition significative s'est produite après quatre jours d'incubation pour toutes les souches de *Bacillus spp*. Encore une fois, les lipopeptides étaient les seuls composés qui ont été détectés en quantités importantes dans ces extraits confirmant

davantages le roles des lipopétides dans l'inhibition de pathogènes testés. Il est intéressant de noter que les quantités de lipopeptides dans la zone d'inhibition étaient plus élevées lorsque B. QST713 et S499 ont été cultivés en confrontation avec le champignon, alors que la présence du pathogène n'a pas eu d'impact positif ou négatif sur la production d'iturines ou de surfactines (Chap.4, Fig.7). Cependant il faut noter que ces quantités étaient variables selon le pathogène et la souche de *Bacillus*. Une corrélation avec l'accumulation des lipopeptides dans la zone d'inhibition a montré une production en quantité élevée des fengycines par S499 en présence de *R. variabilis* par rapport au témoin et aux autres souches de *Bacillus* confrontées aux différents agents pathogènes. En ce qui concerne la souche QST713, nous avons observé une légère production non significative de fengycines récupérée dans la zone d'inhibition par rapport à la culture pure prise comme témoin. Dans la confrontation avec *R. variabilis* et *P. variabile*, nous avons également observé une stimulation de la production de fengycine dans S499 et QST713. Par contre en confrontation entre QST713 et *F. verticiloides*, la production des fengycines a diminué par rapport à la culture pure de cette bactérie considérée comme un témoin. En ce qui concerne les surfactines, elles ont également été produites en grande quantité dans la zone d'inhibition avec tous les agents pathogènes, à l'exception de S499 avec *R. variabilis*. Les iturines ont également été produites en quantité suffisante dans la zone d'inhibition des agents pathogènes, mais cette fois ci, la plus grande production d'iturins a été observée dans la zone d'inhibition de *P. variabilis*. Les résultats en ce qui concerne la S499 et *R. variabilis* en ce qui concerne la production des fengycines en grande quantité en présence de *R. variabilis* ont tiré notre attention et nous a conduit à étudier davantage de la S499 non seulement à cause de sa capacité à inhiber les pathogènes mais aussi à cause de son potentiel élevé de produire les CLPs antifongiques. Dans un premier temps, nous avons testé la capacité de cette souche de coloniser les racines en relation avec la production des CLPs sur ces mêmes racines mais aussi sa capacité de produire les CLPs *in planta* en comparaison au milieu artificiel utilisé pour cette fin et les exsudats d'autres plantes comme la tomate (voir section suivante).

8.3. COLONISATION DES RACINES ET PRODUCTION DES FENGYCINES *IN PLANTA* PAR RAPPORT AUX MILIEUX ARTIFICIELS

Dans l'interaction micro-organismes-plante, la capacité des rhizobactéries à coloniser les racines des plantes est un atout très important (Lugtenberg et al., 2002, Kamilova et al., 2005 ; E. Benizri et al. 2001). Les rhizobactéries étant des hétérotrophes, elles ont besoin des composés

organiques du sol et de ceux largués par les racines des plantes comme source d'énergie. Dans ce cas, la quantité et la composition des exsudats racinaires influencent également la nature des activités bactériennes. Ces dernières résultent de la synthèse de métabolites tels que les antibiotiques, les sidérophores, les substances de croissance (hormones), l'acide cyanhydrique ou les lipopolysaccharides (Voisard et al., 1989 ; Van Peer et al., 1991). Les résultats de cette influence se manifestent alors par une modification de la croissance de la plante et la réduction des infections fongiques de la racine (Kloepper, 1993). C'est ainsi que nous avons d'abord étudié l'activité antagoniste développée par cette bactérie contre *Rhizomucor variabilis* sur graines et plantules de maïs. Nos données montrent un effet protecteur significatif de S499. Ensuite des expériences supplémentaires ont été effectuées sur des plants de maïs âgés de 20 jours élevés dans des conditions gnotobiotiques (perlite stérilisée comme substrat de croissance) afin d'évaluer la colonisation de S499 et la production possible d'antibiotiques *in planta*. Les données révèlent que la bactérie a efficacement colonisé les racines de maïs pour atteindre des populations de $1,1 \pm 0,2$ UFC / g des racines et produit des surfactines en quantités pertinentes ($2,3 \pm 0,4$ µg / ml de rhizosphère) et des fengycines et des iturines mais en quantités non mesurables. Nous avons utilisé une deuxième approche pour évaluer la capacité de l'isolat de *B. amyloliquefaciens* à former éventuellement des métabolites secondaires *in planta* en cultivant S499 dans les exsudats recueillis dans des semis de maïs élevés dans des conditions gnotobiotiques comme unique source nutritionnelle (MRE). Ces exsudats de maïs produits naturellement représentaient une source de nourriture suffisante car ils ont maintenu la croissance de la souche S499 à une valeur de DO₆₀₀ d'environ 0,8. Les lipopeptides des trois familles différentes, c'est-à-dire les surfactines, les fengycines et les iturines, ont également été facilement formés dans ces conditions. De façon intéressante, ces données ont révélé également des quantités relativement élevées de fengycines par rapport au mélange de lipopeptides libérés par S499 après croissance sur d'autres milieux tels que le milieu artificiel LB ou dans le milieu d'imitation d'exsudat d'autres espèces végétales comme la tomate supplémentée avec le C et N (EM) reflétant ainsi la qualité nutritionnelle des produits exsudés par le maïs. A partir de ces résultats, nous avons effectué d'autres essais de confrontation sur plaque sur du milieu MRE gélifié et une zone d'inhibition significative ($7,2 \text{ mm} \pm 1,7 \text{ mm}$) s'est produite après 4 jours d'incubation. Les composés accumulés dans cette zone ont été extraits à partir des morceaux d'agar de 1 cm de diamètre et analysés par UPLC-MS après extraction solide-liquide. Les données ont été comparées à celles obtenues à partir de cultures pures de la souche bactérienne réalisée dans les mêmes conditions. De façon intéressante, les quantités de fengycines dans la

zone d'inhibition était plus élevée par rapport à d'autres familles lorsque *B. amyloliquefaciens* S499 a été cultivée en confrontation avec le champignon, alors que la présence du pathogène n'a pas eu d'impact positif ou négativement sur la production d'iturines ou de surfactines (figure 4). Curieusement *R. variabilis* n'a pas montré non plus d'activité anti-bactérienne contre la souche de *Bacillus* S499. A partir de ces résultats nous avons voulu savoir quelle famille de CLPs spécifique est réellement impliquée dans l'inhibition du pathogènes (voire section suivante).

8.4. LES FENGYCINES SONT LES PRINCIPAUX LIPOPEPTIDES ACTIFS DANS L'INTERACTION DE S499 AVEC *R. VARIABILIS IN PLANTA*

Afin d'étudier le rôle de chaque famille de lipopeptides dans le contrôle de *R. variabilis*, nous avons tout d'abord comparé l'activité d'inhibition de la croissance sur le milieu MER de plusieurs souches et mutants de *B. amyloliquefaciens* / *subtilis* produisant différentes combinaisons des trois familles de CLP. *B. amyloliquefaciens* FZB42 et *B. amyloliquefaciens* S499, qui produisent conjointement des iturines, des surfactines et des fengycines, ont tous deux été capables d'inhiber la croissance du champignon même si S499 présentait une activité antifongique légèrement plus élevée (chap 3, figure 5) en fonction des données de protection des semis (Figure 1). Les souches qui ne produisent pas de lipopeptides ou seulement de très faibles quantités telles que *B. subtilis* BNO1 et *B. subtilis* 168 n'ont pas été capables d'inhiber la croissance du pathogène mettant en évidence le rôle des lipopeptides dans la bioactivité antifongique de ces souches de *Bacillus*. Des dérivés de FZB42 spécifiquement réprimés dans la synthèse de CLPS ont également été inclus dans l'expérience dont les mutants CH1 et CH2 produisant tous deux des iturines mais ne pouvant pas former des surfactines et ne diffèrent entre elles que dans la synthèse de fengycines où la synthèse de cette famille de CLPS est conservée dans CH1. Cette caractéristique a eu un fort impact sur la croissance de *R. variabilis*, ce qui indique une implication claire de ce CLPs dans l'inhibition fongique (figure 5). La surfactine ne joue donc aucun rôle dans l'activité antifongique en se basant sur le faible effet antifongique du mutant AK3 qui n'est capable que de produire seulement les surfactines. Fait intéressant, est de constater que le mutant CH1 qui ne produit que les iturines et les fengycines était plus actif que la souche FZB42, ce qui suggère que les surfactines pourraient en quelque sorte interférer avec l'activité des fengycines. Les résultats montrent donc que les mutants de *Bacillus* FZB42 sélectivement réprimés dans la synthèse d'un ou deux CLPs a révélé que les

mutants dans lequel il y a une coproduction conjointe des surfactines et des fengycines ont abaissé l'activité antifongique globale. Un effet négatif des CLP mixtes a déjà été observé chez *V. dahlia* (Liu et al., 2014) alors que la surfactine ou la fengycine seule ont inhibé la germination des spores et la perméabilisation membranaire, cette bioactivité a été perdue lorsque les deux CLP ont été appliqués en mélange. Ceci a également été démontré sur *R. stolonifer*, où la surfactine a limité ou supprimé l'activité inhibitrice de la fengycine sur la germination des spores et la croissance des hyphes (Tao et al, 2011; Liu et al. 2014). Ce phénomène peut s'expliquer par l'effet stabilisant de la surfactine sur certaines bicouches lipidiques, limitant ainsi la formation de pores dans les membranes fongiques (Tao et al., 2011). Une autre explication possible est que dans certaines conditions et concentrations, les surfactines et les fengycines peuvent coagrégner pour former des complexes inactifs (Cawoy et al., 2015). Comme *B. amyloliquefaciens* CH2 était encore capable d'inhiber légèrement la croissance du phytopathogène, les iturines peuvent contribuer, bien que dans une moindre mesure, à l'activité antifongique. L'importance des fengycines dans l'effet antifongique global de *Bacillus* envers *R. variabilis* est également confirmée par l'activité de la souche 2504, dérivée de *B. subtilis* 168, dans laquelle la production efficace de surfactines et des fengycines a été restaurée (Nihorimbere et al., 2009). A partir de ces résultats, les fengycines pures ont été testées à la fois dans des essais de diffusion en puits pour l'inhibition de la croissance du mycélium et dans des plaques de microtitrage permettant de tester les concentrations inhibitrices les plus faibles. Des concentrations de fengycine allant de 73 à 18,5 µM étaient inhibitrices de la croissance du mycélium sur des plaques d'agar MRE d'une manière dose-réponse. Des concentrations plus faibles de 18,5 µM à 2,5 µM ont également été testées dans des cultures liquides pour inhibiter la germination des conidies et une diminution significative de OD₆₂₀ a été observée en ajoutant des fengycines pures à des concentrations aussi basses que 4,5 µM, ce qui correspond approximativement à la concentration inhibitrice minimale (MIC) (chap3). En se basant donc sur la perte de fonction des mutants spécifiquement réprimés et sur l'activité des composés purifiés, il est clair que les lipopeptides du type fengycine contribuent principalement au potentiel antifongique de la souche S499 contre *R. variabilis*. A notre connaissance cette étude est la première à démontrer l'activité inhibitrice de la fengycine envers ce pathogène particulier avec une très MIC dans la gamme µM. Les Fengycines ont déjà été décrits pour leur effet inhibiteur sur une gamme de champignons phytopathogènes tels que *Podosphaera fusca* (Romero et al., 2007), *Botrytis cinerea* (Touré et al., 2004) ou diverses espèces de *Fusarium* (Wang et al., 2012). Les fengycines agissent ainsi à des faibles concentrations contre plusieurs

champignons, mais les mécanismes moléculaires expliquant cette activité antifongique sont encore peu clairs et peuvent varier en fonction de la cible pathogène. Dans certains cas, cela était clairement lié à la perméabilisation des spores/conidies, inhibant ainsi la germination ou provoquant alternativement une perturbation des cellules hyphales. Comme le révèle les techniques de la microscopie électronique par transmission, les deux phénomènes résultent le plus probablement d'une détérioration des membranes par les CLP (Chitarra et al., 2003, et Etchegaray et al., 2008). Cette activité repose très probablement sur le caractère amphiphile de ces molécules expliquant leur grande affinité pour les bicouches lipidiques (Deleu et al., 2008). Pour appuyer ce mécanisme, Wise et al. ont montré que *F. sambucinum*, *B. cinerea* et *Pythium sulcatum* étaient plus sensibles à la fengycine que *A. solani* ayant une teneur plus élevée en ergostérol (Wise et al., 2014). Tang et al. (2011) ont montré que la fengycine affectait la membrane et les organes cellulaires, mais inhibait également la synthèse de l'ADN chez *R. stolonifer* à de faibles concentrations. Le lipopeptide a provoqué un gonflement et une apoptose des hyphes, une dépolarisation et des dommages de la membrane mitochondriale et l'accumulation de ROS dans les cellules fongiques (Tang et al., 2014). Il existe peu d'études sur les effets des fengycines sur *R. variabilis*, il semble donc que les mêmes mécanismes soient à la base de la forte inhibition de la croissance mycélienne de *R. variabilis* et de sporulation à des faibles concentrations.

8.5. STIMULATION DES LIPOPEPTIDES ANTIFONGIQUES DU TYPE FENGYCINES CHEZ *BACILLUS S499* LORS DE LA PERCEPTION DE *RHIZOMUCOR VARIABILIS*

Après avoir observé une production élevée des fengycines dans la zone d'inhibition de *R. variabilis* par rapport aux autres familles de cLPS, nous avons étudié plus en détail la dynamique de production des lipopeptides par la souche S499 en confrontation avec *R. variabilis* sur des plaques d'agar MRE avec comme stratégie de faire interagir le plus possible les deux microorganismes en faisant une inoculation retardée de 18h de la bactérie au voisinage du mycélium fongique en expansion. Le profil UPLC-MS en temps réel des CLPs dans la zone d'inhibition a révélé une stimulation claire de la production des fengycines (jusqu'à 10 fois plus) entre 8h et 18h après l'inoculation de *Bacillus* par rapport aux plaques témoins où il y avait seulement *Bacillus S499*. Les mêmes expériences ont également été réalisées avec deux autres isolats de *B. amyloliquefaciens* bien décrits afin d'apprécier la spécificité de la souche

concernant une telle communication entre *Bacillus* S499 et *R. variabilis*. Il semble que la stimulation de la fengycine puisse également se produire pour d'autres souches car un effet similaire du champignon, bien que plus faible en amplitude (augmentation de 5,2 fois dans les quantités de fengycine récupérées à 18h après inoculation), a été observée avec la souche FZB42 mais ne semble pas être appliquée à tous les membres de cette espèce puisque aucune stimulation n'a été détectée dans le cas de la souche QST713. Cette augmentation de la production des fengycines corrélait assez bien avec une expression accrue des gènes de biosynthèse correspondants, telle qu'analysée par RT-qPCR à partir des colonies bactériennes productrices. En effet, l'évaluation de l'expression du gène *fenC* a montré que la synthèse des fengycines était surexprimée (figure 7.B) à 12 h après inoculation bactérienne, ce qui suggère une perception précoce d'un signal émis par le champignon. De nombreuses molécules de signalisation utilisées pour la communication entre les microorganismes sont des composés volatils (COV) (Chaves-Lopez et al., 2015, Fernando et al., 2005, Giorgio et al., 20015). Pour chercher à comprendre si la surproduction des fengycines de S499 en présence de *R. variabilis* était provoquée par des composés volatiles, nous avons faits des essais supplémentaires dans des plaques à deux compartiments couramment utilisées pour tester le rôle des substances volatiles dans les interactions interspécifiques (données non présentées). Les résultats obtenus ont montré que la surproduction de fengycines lorsque *B. amyloliquefaciens* S499 est co-cultivée avec *R. variabilis* n'est pas liée aux COV émis par le champignon ni à la détection des modèles moléculaires abrités à la surface cellulaire puisque les deux partenaires n'étaient pas en contact physique. Nos résultats suggèrent donc fortement que cette molécule induisant la production des lipopeptides lorsque *Bacillus* est exposé à *R. variabilis* correspond le plus probablement à un composé soluble diffusant dans le milieu gélifié, car la stimulation de la fengycine n'a pas été observée en cultivant la bactérie et le champignon dans les mêmes conditions ,non plus même dans des plaques à deux compartiments couramment utilisées pour tester la rôle des substances volatiles dans les interactions interspécifiques (données non présentées). D'autres investigations sont encore nécessaires pour identifier les molécules déclenchantes libérées par le champignon dans le milieu. Cette surpression de la synthèse des fengycines dans S499 en présence de *R. variabilis* par rapport à des cultures pures suggérant donc que la bactérie est capable de percevoir un déclencheur moléculaire libéré par le pathogène. Cette stimulation CLP semble être spécifique pour les fengycines puisque la production d'iturines et des surfactines n'a pas été significativement affectée par le champignon. Une telle modulation des antibiotiques lipopeptidiques et de leurs gènes dans *Bacillus* sur la

perception des signaux fongiques est un concept plutôt nouveau avec un impact potentiellement élevé pour le contrôle biologique. Li et al. (2014) ont rapporté que la confrontation de *B. amyloliquefaciens* SQR9 avec *F. oxysporum* a entraîné une augmentation de la production des bacillomycines et des fengycines, tandis que lorsqu'on les a confrontés à *Rhizoctonia solani* et *F. solani*, on a observé une augmentation de la production des surfactines. Dans une étude récente, une production beaucoup plus élevée d'iturines et des fengycines a été observée chez *B. subtilis* 98S co-cultivé avec *Pythium* et *Fusarium* par rapport aux témoins, mais pas en présence de *Botrytis* (Cawoy et al. 2015). Ainsi, il semble qu'un ensemble différent de CLPs peut être activé d'une manière spécifique à la souche et selon le challenger fongique interagissant. Cependant, la base moléculaire de ce phénomène est totalement inconnue à la fois en ce qui concerne la perception des champignons et la transduction du signal en aval conduisant à une synthèse des CLPs régulée à la hausse. Nous nous sommes appuyés sur le récent séquençage du génome de S499 (CP014700-CP014701, Molinatto et al., 2016) pour rechercher certains déterminants génétiques impliqués putativement dans ce processus de régulation conduisant à une expression accrue de la biosynthèse de la fengycine sur la détection fongique. Il est clair que certains facteurs environnementaux et déterminants des plantes peuvent influencer la production d'antibiotiques en général et de CLP en particulier chez les *Bacillus* (Chowdhury et al., 2015). Cependant, peu est encore globalement connu sur les indices des autres communautés microbiennes associées aux plantes qui peuvent avoir un impact sur l'expression de cet antibiome. Dans ce contexte, les données de ce travail illustrent davantage certains résultats possibles résultant de la communication chimique interspécifique. Cela pourrait être très important pour la mise en œuvre de l'efficacité de biocontrôle de *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*. Il est clair que certains facteurs environnementaux et déterminants des plantes peuvent influencer la production d'antibiotiques en général et de CLP en particulier chez les *Bacillus* (Chowdhury et al., 2015). Cependant, peu est encore globalement connu sur les indices des autres communautés microbiennes associées aux plantes qui peuvent avoir un impact sur l'expression de cet antibiome. Dans ce contexte, les données de ce travail illustrent davantage certains résultats possibles résultant de la communication chimique interspécifique. Cela pourrait être très important pour la mise en œuvre de l'efficacité de biocontrôle de *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*.

8.6. PROTECTION DES SEMIS ET DES PLANTULES DANS LES CONDITIONS DE LABORATOIRE EN PHYTOTRON

En se basant sur son potentiel élevé d'inhiber les pathogènes *in vitro*, de protéger les graines et les plantules, laquelle protection est fonction de la production des composés antifongiques en quantité suffisante, *B. amyloliquefaciens* S499 après avoir manifesté un fort effet protecteur par rapport aux autres souches de *Bacillus* et QST713 a été sélectionnée pour d'autres essais de biocontrôle *in situ* réalisés dans une chambre de croissance. Tout d'abord, nous avons testé la capacité de la souche à réduire l'infection des semis de maïs par les quatre pathogènes fongiques à 20 ° C et 29 ° dans des boîtes de pétri humidifiées. Les résultats obtenus montrent que le traitement des graines avec S499 a permis de réduire efficacement l'incidence de la maladie pour tous les agents pathogènes par rapport aux autres souches, bien que la QST713 s'est montré aussi plus efficace. Aux deux températures, le traitement des graines avec *Bacillus* a permis une protection quasi totale des semences et des semis alors que la plupart des témoins non traités mais infectés présentaient une forte pourriture ou une désintégration totale des semis. La souche S499 et QST713 qui se sont montrée comme étant efficace suite à leur potentiel énorme de produire les composés antifongiques révélé après analyse par LC-MS sur exsudats de maïs ont ensuite été testées pour leur capacité à lutter contre les germes pathogènes, à empêcher la pourriture totale des plantes et l'infection foliaire en utilisant des plantes cultivées dans un sol en pots infesté au stade de troisième feuille. Les résultats montrent que le traitement bactérien a réduit significativement non seulement le taux de mortalité, mais aussi l'infection foliaire chez les plants de maïs par rapport aux témoins non traités avec un indice élevé de réduction de la maladie. Encore une fois la souche S499 s'est montrée encore plus efficace que la QST713. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vitro* et démontrent l'efficacité de la bactérie sur tous les pathogènes. Comme nous l'avions mentionné au point précédent, l'inhibition directe du développement du pathogène par la production d'iturines et / ou des fengycines peut représenter le principal mécanisme pour expliquer l'effet protecteur de *Bacillus* dans ces expériences. Ceci est en accord avec d'autres études antérieures concernant l'expression de l'antibiote par S499 *in planta* et qui ont révélé que les lipopeptides cycliques sont les principaux composés bioactifs qui sont facilement sécrétés par les cellules colonisant les racines de tomate, de tabac et d'*Arabidopsis* (Debois et al., 2014, Nihorimbere et al., 2012, Chowdhury et al., 2015). Ces données ont également montré que dans ces conditions, les surfactines étaient formées en quantités beaucoup plus grandes par rapport aux fengycines et aux iturines. Nous avons alors effectué des expériences supplémentaires afin d'évaluer la

capacité de S499 de coloniser les racines et la production de lipopeptides sur des plants de maïs âgés de 20 jours élevés dans des conditions gnotobiotiques. Les données révèlent que la souche S499 a efficacement colonisé les racines de maïs ($1,1 \pm 0,2$ UFC/ g de racine) et produit des surfactines en quantité pertinente ($2 \pm 0,4$ µg / ml de rhizosphère), mais aussi des quantités mesurables de fengycines et d'iturines. Cela n'empêche pas une certaine implication de ces deux derniers composés qui auraient pu être extraits moins efficacement du substrat par rapport aux surfactines. A partir de ces données nous soutenons encore l'hypothèse qu'une certaine stimulation de la résistance systémique dans la plante hôte par S499 pourrait être également impliquée dans la réduction macroscopique de la maladie observée lors de nos expériences. En effet, cette souche a été rapportée comme une puissante inductrice de l'ISR dans une gamme des plantes avec de la surfactine comme principale molécule inductrice perçue par la plante hôte pour amplifier son immunité (Ongena et al. 2007, Cawoy et al. 2014, Debois et al., 2015). Le rapport récent de l'induction de la résistance dans le maïs par une souche endophyte de *Bacillus* et produisant de la surfactine appuie cette hypothèse (Surendra Gond et al. 2014). Surendra Gond et al (2014) ont montré que le traitement des racines de maïs avec (10^6 cellules / ml) des cellules d'une souche de *Bacillus subtilis* SG_JW.03B pendant 2,5 h a conduit à l'induction de gènes liés à la pathogénèse, y compris PR-1 et PR-4, qui ont trait à la défense contre les pathogènes fongiques et concluent que les bactéries endophytes qui se trouvent naturellement dans de nombreuses variétés de maïs peuvent protéger les plantes hôtes en sécrétant des lipopeptides antifongiques qui inhibent les pathogènes et induisent une régulation positive des gènes de défense contre les pathogènes des plantes hôtes (Résistance systémique acquise).

8.7. BIOCONTROLE DES PATHOGENES DANS LES CONDITIONS AGRONOMIQUES

Comme nous l'avons signalé au chap. 2, plusieurs littératures indiquent que certains microorganismes ont prouvé une bonne efficacité pour inhiber les pathogènes *in vitro* ou soit lutter contre les maladies qu'ils occasionnent en conditions contrôlées ou de laboratoire (Jacobsen, 2006). Mais souvent cette bonne efficacité n'est pas garantie en conditions de culture en plein champ où les conditions environnementales sont fluctuantes, imprévisibles et peuvent influencer la survie, la mise place et l'efficacité d'un agent de lutte biologique (Jacobsen, 2006). Pour les maladies des cultures de plein champ, l'absence de fiabilité de l'efficacité de plusieurs

agents de protection biologique est souvent rapportée (Paulitz and Belanger, 2001). Afin de confirmer l'efficacité observée au laboratoire de S499 sur le terrain en tant qu'agent de lutte biologique dans des conditions agronomiques, des expériences sur le terrain ont été réalisées dans deux zones agro-écologiques différentes du Sud-Kivu (Mudaka et Katogota) sur l'ensemble du cycle de croissance du maïs (février-juin 2015). Le site de Mudaka est situé en haute altitude avec un climat tropical humide tempéré avec une température moyenne de 20 ° C tandis que le site de Katogota est en plaine avec un climat tropical semi-aride avec une température moyenne journalière de 30-32°C. Il faut rappeler en outre que ces deux milieux présentent des caractéristiques éco-pédologiques différentes (Chap 2). Les essais ont été réalisés selon un plan en bloc aléatoire complet répété trois fois en utilisant 60 plants par parcelle (3 parcelles par traitement) afin d'évaluer l'efficacité de protection contre *R. stolonifer*, *P. variabile* et *F. verticilloides* qui peuvent causer des dommages dès la plantation. Les pathogènes ont ainsi été inoculés artificiellement par immersion de graines de maïs dans des suspensions de conidies et ces graines infectées ont alors été pulvérisées avec la bactérie avant le semis. Deux semaines après l'émergence des plantes, les résultats montrent que la S499 permet d'augmenter le taux de germination des plantes, favorise l'émergence des plantules en diminuant la mortalité des plants dans les lots traités par rapport aux témoins non traités. Les parties aériennes des plantes qui ont survécu à cette phase de croissance précoce ont été pulvérisées tous les 30 jours avec la bactérie jusqu'à trois mois après le semis. La gravité de la maladie basée sur la taille des lésions symptomatiques typiques causées par chaque agent pathogène a été évaluée avant la floraison. Les résultats ont montré que S499 avait réduit significativement les symptômes de la maladie dans les deux zones agro écologiques conduisant à une réduction de la gravité de la maladie de 50-53% dans les plantes infectées par *Rhizopus* et 60-66% dans les plantes attaquées par *Penicillium*. Dans le cas de *Fusarium*, il y avait une différence significative entre les deux zones agro-écologiques. L'efficacité du contrôle de ce pathogène a été observée dans les deux zones, mais la protection était plus faible à Katogota en basse altitude (39% de réduction de la maladie) qu'à Mudaka en haute altitude (67% de réduction de la maladie) (Chap.3, Figure 4C). Ces résultats en ce qui concerne la réduction de *F. verticilloides* sur les maïs dans les conditions tropicales sont très intéressants parce que les pathogènes de l'espèce *Fusarium verticillioides* (Fv) (Sacc.) Niren. est l'espèce fongique la plus fréquemment signalée qui infecte le maïs à tous les stades de son développement, provoquant la pourriture de la tige, des graines ,des épis entiers et des racines du maïs, et est responsable des pertes économiques importantes dans le monde entier (Hernández-Rodríguez et al., 2008, Leyva-Madrigal et al., 2015). En plus de ses

effets sur le rendement céréalier, l'infection peut nuire à la qualité des grains grâce aux diverses mycotoxines (Czembor et al. 2015). La capacité de S499 de contrôler les pathogènes du maïs après inoculation des semences, le traitement des jeunes plantules au niveau du collet et des plantes en croissance par l'inoculum bactérien au niveau du collet en milieu naturelle aux champs pourrait être associée à sa capacité de coloniser les racines, adhérer aux feuilles et y produire les cLPS. Les dernières observations ont été faites au cours de la phase de maturité des épis après ré-inoculation de l'agent pathogène et S499 (24h), l'objectif étant d'évaluer la capacité de S499 à protéger les graines et les épis à pleine maturité des semences en assurant un niveau de gravité de la maladie suffisamment bas par rapport au témoin. La virulence des agents pathogènes (notamment *Rhizopus* et *Penicillium*) lors de l'infection des épis était plus élevée à Mudaka que sur le site de Katogota, mais l'application de *Bacillus* permettait clairement de réduire les effets nocifs des trois champignons dans les deux localisations (Chap.2, figure 4D). Les dommages sur les épis ont été réduits respectivement de 84%, 61% et 69% dans les plants traités par S499 et infectés par *Rhizopus*, *Penicillium* et *Fusarium* par rapport aux parcelles témoins. L'efficacité du biocontrôle de S499 a donc été observée à tous les stades de croissance de la culture en ce qui concerne à la fois l'incidence sur la mortalité des semis, sur l'infection foliaire et sur les épis. Dans une étude réalisée récemment au Mexique sur une expérience répétée pendant trois ans, après traitement du maïs au champ à Mexico Glenda, Judith Lizárraga-Sánchez et al., 2015 ont démontré l'efficacité des *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 dans le contrôle au champ des *Fusarium verticillioides* depuis le semis jusqu'à la maturité, y compris les épis ainsi que la réduction des fumonisines sur les graines de maïs. En Afrique tropicale subsaharienne avec des caractéristiques proche de notre milieu d'étude, *Bacillus* (isolatEBS8) a été utilisé avec succès pour lutter contre, *Citrobacter* ADS14, *Enterobacter* IGBR11 et *Lysinibacillus* EPR2 contre *Fusarium verticilloides* sur les semences de maïs et *B. subtilis* contre *Aspergillus*, *P. italicum*, *R. solani*, de l'épis de maïs au Nigeria (Abiala et al., 2015, Ekundayo, 2011), *Bacillus subtilis* 101,102 et 204 sur les maladies des feuilles et des racines sur plusieurs cultures au Kenya (Todd Kabaluk et al., 2010).

8.8. EFFETS POSITIFS DE S499 SUR LA CROISSANCE DES PLANTES ET LE RENDEMENT EN GRAIN

A la fin des expériences, on a mesuré plusieurs paramètres de croissance des plantes (Chap.3, tableau 1) notamment, la hauteur des plantes, la surface foliaire et la longueur des racines. Les

résultats ont démontré clairement que ces paramètres de croissance étaient significativement plus élevés dans les parcelles traitées avec S499 comparativement à celles infectées non traitées. Cela a été observé aux deux endroits et avec les trois pathogènes. Nous avons également évalué l'amélioration des rendements des cultures fournies par l'application de S499. La plupart des plantes traitées avec S499 ont produit deux épis avec un nombre similaire de rangées (données non présentées) avec celles non traitées (DC). Cependant, le taux de remplissage des épis et le nombre total de grains par plante ont été significativement améliorés dans les plantes traitées avec la bactérie comparativement au témoin (Disease control) infectée par les trois agents pathogènes (Chap.3, tableau 1). Les résultats obtenus montrent que les paramètres de la taille des plantes et de rendement en grains sont plus élevés dans les parcelles traitées que dans les parcelles témoins sans traitement bactérien. Ceci est reflété par le rendement global (t / ha) et le taux d'accroissement du rendement plus élevé (Chap. 2, Fig. 5). Nos résultats ont montré également que ce rendement global variait en fonction des traitements et des sites. Les hausses de rendement les plus élevées ont été observées à Mudaka avec 76%, 37% et 83% respectivement pour le contrôle biologique de *Rhizopus*, *Penicillium* et *Fusarium* contre 46%, 24% et 17% au site de Katogota. Par contre pour le site de Mudaka, le traitement par S499 a contribué à l'augmentation du rendement jusqu'à 83% lorsqu'il a été appliqué sur des graines et pulvérisé sur les feuilles des plantes infectées par *F. verticilloides*. Ceci est dû assez bien à la forte réduction de l'impact pathogène par S499 en termes de mortalité des plantes, de maladies des feuilles et sur les épis (Chap. 3, Fig. 4) dans ce site. En revanche, l'amélioration du rendement relativement bas fournie par S499 a été également observée avec ce pathogène, mais dans les essais réalisés à Katogota. Ceci s'explique par un faible effet du traitement par S499 sur divers paramètres de la maladie comparativement à Mudaka. Outre l'influence agro-écologique qui caractérisent les sites, l'efficacité du contrôle biologique a également varié avec le pathogène, c'est le cas de *Penicillium* qui a été considérée comme la maladie qui était globalement moins contrôlée efficacement par S499 que celle causée par *Rhizopus*.

Globalement, ce travail a révélé le grand potentiel de *B. amyloliquefaciens* S499 pour réduire les maladies fongiques sur le maïs cultivé dans deux zones agro-écologiques différentes du Sud Kivu. Il est intéressant de noter que la souche a été isolée à l'origine à partir d'un sol cultivé près de la région des essais dans la province de l'Ituri avec des conditions climatiques tout à fait comparables (moyenne à haute altitude, températures atteignant 30°C) (Molinato *et al.*, 2016). A partir de ces essais sur le terrain, il est assez difficile de déterminer les mécanismes exacts utilisés par S499 pour lutter contre l'infection pathogène, mais la bactérie est donc très

probablement bien adaptée aux conditions écologiques qui prévalent dans cette région de l'Afrique centrale. À l'appui, cette souche a également montré un fort potentiel de biocontrôle sur la tomate lors d'essais sur le terrain effectués en basse altitude dans la vallée d'Imbo, plaine de la Ruzizi au Burundi. En effet, il a permis de réduire l'impact d'une importante maladie fongique causée par *Fusarium semitectum* responsable de grandes pertes dans les plantations locales (Nihorimbere et al., 2010). L'adaptation écologique de la bactérie peut aboutir à une forme physique optimale en termes de colonisation de la phyllosphère et d'expression antibiome *in planta* qui représentent tous deux des traits essentiels pour le contrôle biologique. En guise de rappel, l'efficacité de S499 était évidente dans les deux zones, mais la protection était plus faible à Katogota en basse altitude (36% de réduction de la maladie) qu'à Mudaka en haute altitude (62% de réduction de la maladie). Cela pourrait être dû à des conditions agro-écologiques spécifiques, y compris les caractéristiques physico-chimiques du sol, les précipitations, l'humidité relative et la température qui influencerait le développement des pathogènes ou affecteraient la physiologie et donc l'efficacité de l'agent de contrôle biologique. Le rendement plus élevé obtenus dans les deux zones d'étude après traitement par S499 était donc associées à la protection des plantes contre les maladies. Des données préliminaires suggèrent aussi fortement que la souche peut également agir comme biofertilisant par la solubilisation du phosphore et par la production d'hormones de croissance végétale telles que l'acide indole acétique (IAA) dans la rhizosphère. Une étude précédente menée au sein de notre laboratoire avait déjà démontré la capacité de S499 de produire l'acide - Indoles acides acétique et l'acide gibberellique lorsque cette souche était utilisée pour traiter et améliorer le maltage du Sorgho rouge Africain (Bwanganga, 2013). Une telle activité de biofertilisation des bacilles a été décrite et corrélée avec l'IAA et la production de phytase (Budiharjo A et al., 2014, Ryu CM et al., 2003, Nagórnska K., 2007, Rodríguez et Fraga, 1999). D'autres travaux antérieurs ont montré que le traitement des graines (soja, maïs, tomate, pois) avec *Bacillus* stimule la croissance des plantes, la germination des graines et assure la solubilisation du phosphore dans le sol (Cavaglieri et al., 2005, Etchegaray et al., 2008, Uma Maheswar et Sathiyavani, 2012).

8.9. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Malgré le développement d'autres molécules de synthèse chimique très efficaces, l'utilisation des pesticides aura démontrée qu'une gestion strictement basée sur l'emploi des produits chimiques restera toujours fragile à plusieurs niveaux quel que soit le produit ou la formulation,

car l’acquisition de la résistance chez les nuisibles, la pollution environnementale et les résidus de ces molécules chimiques sur les aliments demeurent possibles. Dans le pays en développement même si les produits de synthèse ne sont pas utilisés en grande quantité, probablement c’est la région où ils posent assez de problèmes sur l’environnement et les consommateurs suite à une mauvaise utilisation (non-respect des doses, manque de formation et d’information des agriculteurs, intoxication involontaires des utilisateurs et mauvaises gestion des emballages, chap 1).

Au point de vue appliqué, dans ce travail nous avons démontré la capacité de *Bacillus* S499 sélectionnée dans une gamme de souches pour leur capacité d’inhiber *in vitro* et d’assurer *in planta* la protection des plantules de maïs contre les pathogènes responsables de perte de rendement du maïs dans deux zones agropédologiques différentes du Sud-Kivu en RD Congo en corrélation avec leur capacité de produire les lipopeptides antifongiques. En effet trois familles de cLPS ayant chacune un rôle spécifique dans le biocontrôle ont été produites par S499 dans les conditions de la rhizosphère sur exsudats du maïs à savoir la surfactines (colonisation des racines, stimulation du système immunitaire des plantes, les fengycines (inhibition des pathogènes grâce à ses effets fongitoxiques) et les iturines (fongitoxiques). Pour confirmer les résultats de laboratoire, une série d’expériences menaient dans les conditions naturelles en milieu tropical du Sud-Kivu à l’Est de la république démocratique du Congo a montré la capacité de *B. S499* de contrôler tous les pathogènes testés sur les semences, les plantes et réduire les pourritures des épis. L’inoculation des semences, le traitement des plantes en cours de croissance et le traitement des épis par S499 ont également montré que cette souche a contribué significativement à la croissance des plantes et une augmentation du rendement en épis de 17-83% par rapport au témoin selon le pathogène et la zone agroécologique. Une telle augmentation du rendement et la croissance des plantes est lié indirectement à la capacité de cette souche de réduire les effets néfastes des pathogènes, laquelle dépend de l’aptitude de cette dernière de coloniser les racines, produire les composés antifongiques qui interviennent dans une combinaison simultanée de différents mécanismes d’action dans le biocontrôle d’une part et d’autre part la capacité de cette souche de produire l’acide indole acétique comme hormone de croissance et de solubiliser le phosphore du sol. Ces résultats montrent que *B. S499* est adaptée au milieu tropical où elle est originaire et peut être produite à grande échelle dans l’avenir pour être exploité comme biopesticides dans le milieu. Après cette étude, nous avons testé l’effet protecteur des plusieurs souches de *Bacillus* disponibles dans notre collection en vue d’élargir le nombre des souches susceptibles d’être exploitées comme biopesticides dans le

Kivu et dans la région des grands lacs d'Afrique centrale, dans cette collection, la souche QST713 qui est déjà exploitée dans certains pays de l'Afrique de l'Est et Australe (Kenya, Tanzanie, Afrique du Sud et Ouganda) s'est montrée aussi efficace pour élargir le nombre des souches susceptibles d'être exploitées comme biopesticides dans ce milieu. Dans ce contexte l'installation des unités de production susceptibles de s'adapter aux conditions locales comme c'est le cas de production en bioréacteurs (milieu de culture liquide riche) afin de générer des starters de bonne qualité d'un point de vue pureté microbiologique et stables (produits lyophilisés contenant les formes résistantes spores, conidies, des microorganismes d'intérêt) pour fournir ces produits aux fermiers du Kivu et de la région des grands lacs d'Afrique centrale en général pour qu'ils puissent être utilisés au champ est d'une importance capitale. Cette dernière présente l'avantage que ce soit en système rotatif ou à plateaux d'être moins coûteuse et techniquement plus facile à mettre en place au pays sud et peut valoriser les substrats locaux peu chers et facilement disponibles dans une qualité relativement constante et issus de l'économie circulaire. Il apparaît donc que le transfert de cette technologique pourrait permettre à terme l'autosuffisance et une certaine pérennité concernant la fabrication du produit et dont l'application pourrait dans le futur être étendue à d'autres domaines de valorisation des microorganismes pour assurer la sécurité alimentaire et le bien-être de la population locale. Les pays de la CEPGL pourraient se servir du modèle Cubain et Indien pour le développement des agents de lutte biologique (BCA) plus rentable, un exemple réussi d'intervention gouvernementale est celui de Cuba où un vaste réseau d'unités locales de production de BCA a été dispersée dans le pays pour fournir les BCA à plus de 1 000 000 ha de cultures horticoles par an. Cette situation s'expliquait en partie par la situation politique au Cuba qui a conduit à une pénurie de produits phytosanitaires conventionnels (Cherry & Gwynn, 2007).

Sur le plan fondamental, les résultats de notre étude ont montré que la S499 était en mesure de percevoir les signaux moléculaires émis par un des pathogènes, *Rhuzomucor variabilis* et que suite à cette perception, elle module à la hausse la production des lipopeptides par rapport aux cultures pures dans les conditions naturelles de la rhizosphère. Pour établir le rôle spécifique de chaque cLPS, après utilisation de souches productrices de trois familles de lipopeptides et des mutants dont l'un ou deux familles sont réprimés où soit produisant ces antibiotiques en petite quantité. Nos données montrent que les CLP du type fengycine sont les principaux composés impliqués dans l'activité inhibitrice à des très faibles concentrations de l'ordre des μM , mais aussi que la production de ce dernier est sensiblement sur-régulée lors de la perception du champignon par rapport aux cultures pures. *B. amyloliquefaciens* S499 est ainsi capable de

percevoir des molécules fongiques qui sont émises et, en réponse, de réguler à la hausse la biosynthèse de certains composés spécifiques de son arsenal antimicrobien. Plus important encore, nous avons montré dans cette étude que la synthèse de fengycine dans *Bacillus* est surexprimée en présence de *R. variabilis* par rapport à des cultures pures suggérant que la bactérie est capable de percevoir un déclencheur moléculaire libéré par le pathogène. Cette stimulation CLP semble être spécifique pour les fengycines puisque la production d'iturines et des surfactines n'a pas été significativement affectée par le champignon. Une telle modulation des antibiotiques lipopeptidiques et de leurs gènes dans *Bacillus* sur la perception des signaux fongiques est un concept plutôt nouveau avec un impact potentiellement élevé pour le contrôle biologique. Il est donc nécessaire de poursuivre cette étude pour comprendre la base moléculaire de ce phénomène totalement inconnue à la fois en ce qui concerne la perception des champignons et la transduction du signal en aval conduisant à une synthèse de CLP régulée à la hausse chez la bactérie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adebanjo, A. and Bankole, S. A. (2004). Evaluation of some fungi and bacteria for biocontrol of anthracnose disease of cowpea. *J. Basic Microbiol.* 44, 3–9. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310310>.
- Ahimou, F., Jacques, P. and Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 749–754. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7).
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., & Korsten, L. (2010). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.* 29, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.001>.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol. Fertil. Soils.* 40, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0766-y>.
- Atieno, M., Herrmann, L., Okalebo, R., Lesueur, D. (2012). Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 2541–2550. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1062>.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T. (2000). Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium sp.* Strain Isolated from Sunflower Roots. *Appl Environ Microbiol* .66, 3393. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000>. Updated.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*. 184, 529–544. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03014>.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: The European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>.
- Alina, S. O., Constantinscu, F., Petruța, C. C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Rom Biotech Let.* 20, 10737–10750.

- Arkipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil.* 272, 201–209.. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047>.
- Ashlee M. Earl, Richard Losick, R. K. (208AD). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Curr Trends Microbiol* 16, 1–11. <https://doi.org/1doi:10.1016/j.tim.2008.03.004>.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Zahirul, M., Shahidullah, S. M., Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *J. Biotechnol.*, 8, 1247–1252.
- Ashwini, N., Srividya, S. (2013). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech.* 4, 127–136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>.
- Adebanjo, A. and Bankole, S. A. (2004). Evaluation of some fungi and bacteria for biocontrol of anthracnose disease of cowpea. *J. Basic Microbiol.* 44, 3–9. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310310>.
- Ahimou, F., Jacques, P. and Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 749–754. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7).
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L. (2010). Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.* 29, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.001>.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol. Fertil. Soils.* 40, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0766-y>.
- Atieno, M., Herrmann, L., Okalebo, R., Lesueur, D. (2012). Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World J Microbiol Biotechnol* , 28, 2541–2550. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1062>.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T. (2000). Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing Rhizobium sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. *Appl Environ Microbiol* .66, 3393. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000>. Updated.

- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*.184(3), 529–544. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03014>.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: The European situation. *Eur. J. Plant Pathol.*114, 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>.
- Alina, S. O., Constantinscu, F., Petruța, C. C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Rom Biotech Let.*20, 10737–10750.
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil.*272, 201–209.. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047>.
- Ashlee M. Earl, Richard Losick, R. K. (208AD). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Curr Trends Microbiol* 16, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Zahurul, M., Shahidullah, S. M., Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *J. Biotechnol.*, 8, 1247–1252.
- Ashwini, N., Srividya, S. (2013). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech.*4, 127–136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>.
- Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. T., Sandberg, G., & C.T. Wheeler, and G. S. R. A. A. C. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta.*175, 532–538. <https://doi.org/10.1007/BF00393076>.
- Amella N, Burtin G, Bartoli F, Heulin T. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effects on rhizosphere soil aggregation. *Appl Environ Microbiol Appl. Environ Microbiol.* 64, 3740–3747. from <http://aem.asm.org/cgi/content/long/64/10/3740>.
- Anderson, M. S., Garcia, E. C. and Cotter, P. A. (2014). Kind Discrimination and Competitive Exclusion Mediated by Contact-Dependent Growth Inhibition Systems Shape Biofilm Community Structure. *PLoS Pathog.* 10, 274–302. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004076>.

- Anderson, T. D., Miller, J. I., Fierobe, H. P., & Clubb, R. T. (2013). Recombinant *Bacillus subtilis* that grows on untreated plant biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 867–876. <https://doi.org/10.1128/AEM.02433-12>.
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil.* 272, 201–209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047>.
- Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Appl Microbiol.* 108, 386–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438>.
- Ash C., Priest FG., C. M. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 64, 253–260.
- Ashlee M. Earl, Richard Losick, R. K. (208AD). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol Fertil Soils.* 40, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0766>.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Zahirul, M., Shahidullah, S. M., & Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *J. Biotechnol.* 8, 1247–1252.
- Ashwini, N. and Srividya, S. (2013). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech.* 4, 127–136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>.
- Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. T., Sandberg, G., & C.T. Wheeler, and G. S. R. A. A. C. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta,* 175(4), 532–538. <https://doi.org/10.1007/BF00393076>.
- Amellal N, Burtin G, Bartoli F, Heulin T. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effects on rhizosphere soil aggregation. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3740-3747.

Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact* 8:1-12. doi: 10.1186/1475-2859-8-63.

Abdallah, D.B., and Tounsi, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of Agrobacterium tumefaciens strains. *Appl. Microbiol.* 119, 196-207. doi:10.1111/jam12797

Ashwini, N., and Srividya, S. (2013). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1.3 Biotech. 4, 127-136. doi: 10.1007/s13205-013-0134-4

Abdullah Mohammed Al-Sadi, Aisha Gharib Al-Ghaithi NA-F and RA-Y(2014). Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. *Int J Agric Biol.* ;16:371–6

Alvarez F, Castro M, Príncipe A, Borioli G, Fischer S, Mori G, Jofré E(2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP 218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J Appl Microbiol* . 112: 159–174. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182>.

Autrique A et Perreux D., 1989. Maladies et ravageurs des cultures de la région des Grands Lacs d'Afrique Centrale, Bruxelles :DGCD, Publications du service agricole n°24,232 pages.

Alavifard, F. and. Etebarian, N. S. (2012). Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Iran. J. Plant Path.*, 48, 17–26.

Borriss R (2011) Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*, Springer, Heidelberg, pp 41-76

Budiharjo A, Chowdhury SP, Dietel K, Beator B, Dolgova O, Fan B, Borriss R (2014) Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* sp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and *RBAM17410* genes are involved in plant-microbe-interactions. *PLoS One* 9:1-13. doi: org/10.1371/journal.pone.0098267

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478-486. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001

Borriss, R. (2011). Use of Plant-Associated Bacillus Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*, (pp. 41-76). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. doi: 10.1007/978-3-642-20332-9

Budiharjo A, Chowdhury SP, Dietel K, Beator B, Dolgova O, Fan B, Borriss R (2014) . Transposon mutagenesis of the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* sp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and *RBAM17410* genes are involved in plant-microbe-interactions. *PLoS One* 9:1-13. doi: org/10.1371/journal.pone.0098267

Buyckx E.J.E.,1962. Précis des maladies et des insectes nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda et au Burundi ,Bruxelles :INEAC,Division de Phytopathologie et d'Entomologie Agricole ,780Pages.

Baindara, P., Mandal, S. M., Chawla, N., Singh, P. K., Pinnaka, A. K., Korpole, S. (2013). Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express* (Vol. 3, p. 2). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-2>.

Bais, H. P., Fall, R., Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiol.* 134, 307–319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712.zobacterium>.

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.

Bakker, P. A. H. M., Doornbos, R. F., Zamioudis, C., Berendsen, R. L.,Pieterse, C. M. J. (2013). Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *Plant Pathol.* J.29, 136–143. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0111>

Bardin, M., Miguel Lopez-Ferber, B. G. , Myriam Siegwart, Philippe C. N. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front Plant Sci.* 6, . 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>.

Bardin, M., Schmitt, A., Nicot, P. C. (2013). Diversity in the effect of an extract from *Fallopia sachalinensis* on isolates of cucurbit powdery mildews grown on melon. *IOBC-WPRS Bulletin* Vol., 88, 93–97.

Bashan, Y., Puente, M. E., Rodriguez-Mendoza, M. N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera- Cerrato, R., Pedrin, S. (1995). Survival of *Azospirillum brasiliense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl Environ Microbiol* 61, 1938–1945.

Baysal, Ö., Lai, D., Xu, H. H., Siragusa, M., Çalışkan, M., Carimi, F., Tör, M. (2013). A Proteomic Approach Provides New Insights into the Control of Soil-Borne Plant Pathogens by Bacillus Species. *PLoS One*. 8,1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053182>.

Bateman RP (1997) Methods of application of microbial, pesticide formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Memoires Entomol Soc Canada*.171:69–81 , •
•<https://doi.org/10.4039/entm129171069-1>.

Beattie, G. A. (2006). Plant-Associated Bacteria. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances (Novozymes, pp. 1–56). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_1.

Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., Conrath, U. (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*.21, 944–53. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062158>.

Bell, A. A., & Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol*. 24, 411–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>.

Benizri, E., Baudoin, E., & Guckert, a. (2001). Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol Sci Technol*.11, 557–574. <https://doi.org/10.1080/09583150120076120>.

Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O., & Heulin, T. (2000). Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 2, 333–342. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00114.x>

Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol*.65, 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>.

Bunster, L., Fokkema, N. J., Schippers, B. (1989). Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl Environ Microbiol*.55, 1340–1345. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868/?tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Burse, A., Weingart, H., Ullrich, M. S., Burse, A., Weingart, H., Ullrich, M. S. (2004). NorM, an *Erwinia amylovora* Multidrug Efflux Pump Involved in In Vitro Competition with Other Epiphytic Bacteria NorM, an *Erwinia amylovora* Multidrug Efflux Pump Involved in Vitro Competition with Other Epiphytic Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 70, 693–703. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.693>.

Cawoy H, Debois D, Franzil L, De Pauw E, Thonart P, Ongena M (2015) Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/ amyloliquefaciens*. *Microb Biotechnol* 8:281-295. doi: 10.1111/1751-7915.12238

Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J, Ongena M (2014) Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact* 27:87-100. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0262

Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Borriß R (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* 140:27-37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.10.011.

Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriß R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front Microbiol* 6:1-12. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.

Chitarra GS, Breeuwer P, Nout MJR, Van Aelst AC, Rombouts FM, Abee T (2003) An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J Appl Microbiol* 94:159–166. doi: org/10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x

Compan S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951-4959. doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.

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. *Res Microbiol* 156:748-754. doi: 10.1016/j.resmic.2005.03.001.

Cairns, L. S., Hobley, L., Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* 93, 587–598. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>.

Cairns, L. S., Hobley, L., Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.* 93, 587–598. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>.

Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dyé, F., ... Prigent-Combaret, C. (2013). Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87, 65–77.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.009>.

Chambers K.R.,1987. Ability of fungal isolates from maize and sorghum to infect roots and reduce seedlings emergence of two maize hybrids .Plant Disease,71:736-739

Chen, J. L., Sun, S. Z., Miao, C. P., Wu, K., Chen, Y. W., Xu, L. H., Zhao, L. X. (2015). Endophytic Trichoderma gamsii YIM PH30019: A promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of Panax notoginseng. *J Ginseng Res.* 40, 274–302. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.09.006>.

Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., ... Borriß, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* 140, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>.

Chenu, C. (2016). Interactions Between Microorganisms and Soil Particles Part I Fundamentals of Soil Particle ± Microorganism Interactions. In I. between soil particles and microorganisms and the terrestrial ecosystem (p. 27). U. : J. W. and S. L. In: P.M. Huang , J.M. Bollag , N. Senesi & <Http://prodinra.inra.fr/record/62523> (Eds.), Interactions between soil particles and microorganisms - Impact on the terrestrial ecosystem:an overview, p 274–302).

Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., & Oppenheim, A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant Soil.*129, 85–92. <https://doi.org/10.1007/BF00011694>.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*,124, 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.

Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X.,Borriß, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front Microbiol.* 6, 274–302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.

Ciuffreda, E., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. (2015). *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches. *Microorganisms*, 3(4), 625–640. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040625>.

Combes-Meynet, E., Pothier, J. F., Moënne-Locoz, Y., Prigent-Combaret, C. (2011). The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol Plant Microbe Interact.*

24, 271–284. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0148>.

Contesto, C., Milesi, S., Mantelin, S., Zancarini, A., Desbrosses, G., Varoquaux, F., Touraine, B. (2010). The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *arabidopsis* to the rhizobacterium *phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*, 232, 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1264-0>.

Crowe, J. D., Olsson, S. (2001). Induction of Laccase Activity in *Rhizoctonia solani* by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* Strains and a Range of Chemical Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2088–2094. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2088-2094.2001>.

Cherry, A. J., Lomer, C. J., Djegui, D., Schulthess, F. (1999). Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. *Biocontrol*, 44, 301–327. <https://doi.org/10.1023/A:1009991724251>.

Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., Oppenheim, A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant Soil* 129, 85–92. <https://doi.org/10.1007/BF00011694>.

Común, a L. F., Wepuhkhulu, M., Kimenju, J., Anyango, B., Wachira, P., Kyalo. (2011). Effect of Soil Fertility Management Practices and. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 27–34.

Cruz J. F., Troude F., Griffon D. , Hébert J. P., 1988. Conservation des grains en régions chaude, Techniques rurales en Afrique, CEEMAT-Centre d'Études et d'Expérimentation du Machinisme Agricole et Tropical, Ministère de la coopération et du développement, 2e édition, 548 pages.

Convention de Rotterdam sur la procédure de consentement préalable en connaissance de cause applicable à certains produits chimiques et pesticides dangereux qui font l'objet d'un commerce international. FAO/PNUE, Rome/Genève. 1998. [informations complémentaires et texte de la Convention consultable à <http://www.pic.int>].

Cawoy, H., Bettoli, W., Fickers, P. and Ongena, M. (2011). *Bacillus* -Based Biological Control of Plant Diseases. In *Pesticides in the Modern World- Pesticides Use and Management*, 1849, 273-298.

Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Dommes, J. and Ongena, M. (2014). Plant Defense Stimulation by Natural Isolates of *Bacillus* Depends on Efficient Surfactin Production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 87-100. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0262-R

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P. and Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens. *Microb. Biotechnol.* 8, 281-295. doi: 10.1111/1751-7915.12238

Chaves-Lopez, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *J. Appl. Microbiol.* 119, 487-499. doi: 10.1111/jam.12847

Chen, X.H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Sussmuth, R.D., and Borris, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188, 4024-4036. doi:10.1128/JB.00052-06

Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., et al. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* 25, 1007-1014. doi:10.1038/nbt1325.

Chowdhury ,S.P., Hartmann A., Gao X. and Borris R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front. Microbiol.* 6, 1-11. doi:10.3389/fmicb.2015.00780.

Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., Rombouts, F. M. and Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J. Appl. Microbiol.* 94, 159-166. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x

Choudhary, D. K. and Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res.* 164,493–513. doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007

Chowdhury ,S.P., Hartmann A., Gao X. and Borris R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front. Microbiol.* 6,;1-11. doi:10.3389/fmicb.2015.00780.

Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., Rombouts, F. M. and Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J Appl Microbiol.* 94,159–166. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x

Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J, Ongena M(2014) . Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production.*Mol Plant Microbe Interact.*27:87-100. doi:10.1094/MPMI-09-13-0262.

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P. and Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens. *Microb Biotechnol.* 8,281–295. doi: 10.1111/1751-7915.12238

Chaves-Lopez, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *J Appl Microbiol.* 119, 487–499. doi: 10.1111/jam.12847

Cavagliari 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. *Res Microbiol* 156:748-754. doi: 10.1016/j.resmic.2005.03.001.

Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Boriss R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front Microbiol* 6:1-12. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.

Demoz, B. T., Korsten, L. (2006). *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control*, 37(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.010>.

Duijff, B. J., Meijer, J. W., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B. (1993). Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Neth J Plant Pathol.*, 99, 277–289. <https://doi.org/10.1007/BF01974309>.

Dangl, J. L., Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>.

Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 261–289. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.004>.

De-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res.* 38, 4222–4246. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.014>

De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Bashan, Y., Maier, R. M. (2010). *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ Exp Bot.* 69, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>.

De Waard, M. A., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Stergiopoulos, I., Zwiers, L. H.

- (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Pest Manag Sci. 62, 195–207. <https://doi.org/10.1002/ps.1150>.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. Environ Microbiol Rep. 7, 570–582. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12286>.
- Diallo, S., Crépin, A., Barbey, C., Orange, N., Burini, J. F., Latour, X. (2011). Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. FEMS Microbiol Ecol. 75, 351–364. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01023>.
- Dik, A. J., and Elad, Y. (1999). Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. Eur J Plant Pathol. 105, 123–137. <https://doi.org/10.1023/A:1008778213278>.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. J Appl Microbiol. 99, 1271–1281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02738>.
- Dkhili, M. D. I. (2012). Biological Control of Potato Leak with Antagonistic Fungi Isolated from Compost Teas and Solarized and Non-Solarized Soils. Pest Technology, 6, 32–40.
- Doan, T. (2003). Etude fonctionnelle du génome de *Bacillus subtilis*: de nouvelles régulations transcriptionnelles du métabolisme central du carbone . Thèse. 'Institut National Agronomique Paris-Grignon, France, Paris, France.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant Soil. 6, 155–164. <https://doi.org/10.1023/A:1004658000815>.
- Don Cronin, Yvan Moënne-Loccoz, Anne Fenton, Colum Dunne, David N, Dowling, F. O. (1997). Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiol Ecol. 23, 95–106. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(97\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(97)00010-X).
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., Zhang, L. H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature. 411, 813–817. <https://doi.org/10.1038/35081101>.

Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Shachnai, A. (1998). Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus. *Biological Control*, 12(2), 97–101. <https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0615>

Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Tec*. 52, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>.

Duffy, B., Schouten, A., Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self -defense : Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. *Annu Rev Phytopathol*. 41, 501–538. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>.

Duijff, B. J., Meijer, J. W., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B. (1993). Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent Pseudomonas spp. *Neth J Plant Pathol*; 99, 277–289. <https://doi.org/10.1007/BF01974309>.

Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Vater, J. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13294–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13294>.

Debois D, Jourdan E, Smargiasso N, Thonart P, De Pauw E, Ongena M (2014) Spatiotemporal monitoring of the microbiome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Chem* 86:4431-4438. doi: 10.1021/ac500290s.

Debois D, Ongena M, Cawoy H, De Pauw E (2013) MALDI-FTICR MS imaging as a powerful tool to identify *Paenibacillus* antibiotics involved in the inhibition of plant pathogens. *J Am Soc Mass Spectrom* 24:1202-1213. doi: 10.1007/s13361-013-0620-2.

Debois D, Fernandez O, Franzil L, Jourdan E, de Brogniez A, Willems L, Ongena M (2015) Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environ Microbiol Rep* 7:570-582. doi: org/10.1111/1758-2229.12286

Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP (2016) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and *Bacillus oryzicola* are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1212-1217. doi: 10.1099/ijsem.0.000858

- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* 94, 2667-2679. doi: 10.1529/biophysj.107.114090
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L. and Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 570-582. doi: 10.1111/1758-2229.12286
- Debois, D., Jourdan, E., Smargiasso, N., Thonart , P., De Pauw, E. and Ongena M. (2014). Spatiotemporal monitoring of the antibiome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.* 86, 4431-44388. doi: 10.1021/ac500290s
- Etchegaray, A., De Castro Bueno, C., De Melo, I. S., Tsai, S. M., De Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M. E. and Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Arch. Microbiol.* 190, 611-622. doi: 10.1007/s00203-008-0409-z
- Edwards, S. G., and Seddon, B. (2001). Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 91,652–659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01430>
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (2007). *Botrytis: Biology, pathology and control*. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 1–403). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>.
- El Zemrany, H., Czarnes, S., Hallett, P. D., Alamercey, S., Bally, R., Jocteur Monrozier, L. (2007). Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Plant Soil.* 291,109–118). <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9178-0>.
- El-Mohamedy, R. S. R., Abdel-Kareem, F., Daami-Remadi, M. (2014). Chitosan and *Trichoderma harzianum* as Fungicide Alternatives for Controlling Fusarium Crown and Root Rot of Tomato. *Tunis J Plant Prot.* 9, 31–43.
- Eric, V. (1994). Zwittermicin A-Producing Strains of *Bacillus* from Diverse Soilst, 60, 4404–4412.
- Etchegaray, A., De Castro Bueno, C., De Melo, I. S., Tsai, S. M., De Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M. E., Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Arch Microbiol.* 190, 611–622. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0409>.

Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S. and Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil. Biol. Biochem.* 37, 955-964. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.10.021

Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 3468-3496. doi: 10.1021/cr0503097

Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* .43, 337–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>.

FAO, 2003. Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides, Directives pour le contrôle de la qualité des pesticides, version adoptée lors de la cent-vingt-troisième session du Conseil de la FAO, Rome.

Fleischer G.et al., 1998. Analyse socio-économique de la filière des pesticides en Côte d'Ivoire, Une Publication du Projet de Politique des Pesticides en collaboration avec la Direction de la Protection des Végétaux et de la Qualité, Ministère de l'Agriculture et des Ressources Animales de la Côte d'Ivoire, Série de Publication du Projet de Politique des Pesticides, n°06/F, novembre1998,(http://www.biw.kuleuven.be/aee/clo/idessa_files/Fleischer1998.pdf,10 /07/2016).

Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., and Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol Biochem* . 37, 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.021>.

Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol*. 9. 275–296://doi.org/10.1146/ANNUREV.PY.09.090171.001423.

Fravel, D., Olivain, C.and Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3), 493–502. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>.

Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* , 43, 337–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>.

Fritig, B., Heitz, T., & Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 16–22. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80025](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80025).

Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 3468-3496. doi:

10.1021/cr0503097.

Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 43:337-59. doi:[org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924).

Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S. and Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol Biochem*.37, 955–964. doi: [10.1016/j.soilbio.2004.10.021](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.021).

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age?. *Curr Trends Biotechnol* . 30, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>.

Govender, V., Korsten, L.,and Sivakumar, D. (2005). Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biol Technol* , 38, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.04.005>.

Grzywacz, D., Cherry, A., Gwynn, R. (2009). Biological pesticides for Africa: Why has so little of the research undertaken to date resulted in new products to help Africa's poor? *Outlooks on Pest Management*, 20, 77–81. <https://doi.org/10.1564/20apr09>.

Giorgio, A., Stradis, A. De, Cantore, P. L. and Iacobellis, N. S. (2015). Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front Microbiol*.6, 1–13. doi: [10.3389/fmicb.2015.01056](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01056).

Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L. J., Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*.245, 83–93. <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>.

García-Gutiérrez L, Zeriouh H, Romero D, Cubero J, de Vicente A, Pérez-García A (2013) The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb Biotechnol* 6:264-274. doi: [org/10.1111/1751-7915.12028](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028).

Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiol Res* 172:79-87. doi: [org/10.1016/j.micres.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004)

Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61(6), 693–698. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00365-5)

Hunter, D.M., R.J. Milner, and P.A. Spurgin. 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera:Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina:Hyphomycetes). Bull Entomol Res . 91:93-99. doi.org/10.1079/BER200080

Hanene R, Abdeljabbar H, Marc R, Abdellatif B, Ferid L, Najla SZ (2012) Biological control of Fusarium foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil. Afr J Biotechnol .11:8464-8475. doi: org/10.5897/AJB11.2887.

Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. Cellular Microbiology, 13(11), 1824–1837. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01664>.

Idris, H. A., Labuschagne, N., Korsten, L. (2008). Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. Biol Control. 45, 72–84.

Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthélémy JP, Thonart P, Ongena M (2009) Insights into the Defense-Related Events Occurring in Plant Cells Following Perception of Surfactin-Type Lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Mol Plant Microbe Interact.22:456-468. doi: 10.1371/journal.pone.0106041.

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E. and Thonart, P. (1999). Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. Appl. Biochem. Biotech. 77, 223-234. doi: 10.1385/ABAB:77:1-3:223

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthelemy, J.P., Thonart, P., and Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Mol. Plant-Microbe Interact. 22, 456-468. doi: 1094 / MPMI -18-0562.

Karanja N., Mutua G., Kimenju J. (2007) Evaluating the effect of *Bacillus* and *Rhizobium* bi-inoculant on nodulation and nematode control in *Phaseolus vulgaris* L. In: Bationo A., Waswa B., Kihara J., Kimetu J. (eds) Advances in Integrated Soil Fertility Management in sub-Saharan Africa: Challenges and Opportunities. Springer, Dordrecht, pp 865-872. DOI: 10.1007/978-1-4020-5760-1_82.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by

phosphate solubilizing fungi – current perspective. Arch Agron Soil Sci.56,73–98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>.

Kaseko H U., 2010. Plan de lutte antiparasitaire et de gestion des pesticides (rapport provisoire), Ministère des finances, bureau central de coordination « B.Ce.Co.», Projet de Développement de Pôles de Croissance (PDPC), Financement : PDPC-PPF, n°Q805 IDA-DRC.

Korsten, L., De Jager, E. S. (1995). Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yea. 18, 124–130.

Korsten, L., De Villiers, E. E., Wehner, F. C., Kotzé, J. M. (1997). and Fungicides for Control of Preharvest Fruit Diseases of Avocado in South Africa. Plant Disease, 81, 455–459. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.455>

Kucey, R. M. (1987). Increased Phosphorus Uptake by Wheat and Field Beans Inoculated with a Phosphorus-Solubilizing *Penicillium bilaji* Strain and with Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Appl Environ Microbiol. 53, 2699–2703.

Kwon J, Kang S, Kim J, Park C (2001) Rhizopus Soft Rot on Cherry Tomato Caused by *Rhizopus stolonifer* in Korea. J Microbiol 29:176-178. doi: 10.4489/MYCO.2006.34.3.151.

Kabaluk, J. Todd, Mark. S. Goettel, Antonet M. Svircev, and Stephanie G. Woo (ed.). 2010. The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide. IOBCGlobal. 99pp. Available online through www.IOBC-Global.org

Kachuei, R., Yadegari, M. H., Rezaie, S., Allameh, A., Safaie, N., Zaini, F., & Khanezad Yazdi, F. (2009). Investigation of stored wheat mycoflora, reporting the *Fusarium cf. langsethiae* in three provinces of Iran during 2007. Ann Microbiol .59, 383–390. <https://doi.org/10.1007/BF03178344>

Koumoutsi, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., et al. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J. Bacteriol. 186, 1084-96. doi:10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004.

Kaškonienė, V. et al. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 1323–1335 . doi:10.1007/s00253-017-

8088-9.

Lemessa, F., Zeller, W. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control*. 42, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.014>

Laditi, M. A (2012). Evaluation of microbial inoculants as biofertilizers for the improvement of growth and yield of soybean and maize crops in savanna soils. *Afr. J. Agric. Res.* 7, 405–413. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.904>.

Lana Reid LM, Zhu X (2005) Criblage du maïs quant à sa résistance aux maladies courantes au Canada, Centre de recherches de l'Est sur les céréales et oléagineux, Agriculture et Agroalimentaire Canada, N° de catalogue : A42-103/2005f-, 26 pg.

Leclère V, Béchet M, Adam A, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Jacques P (2005) Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organisms Antagonistic and Biocontrol Activities. *Appl Environ Microbiol* 71:4577-4584. doi: org/10.1128/AEM.71.8.4577.

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-56. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q. and Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* 5, 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2014.00636

Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-moussa, H. and Avis, T. J. (2014). Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biol.* 118, 855-861. doi: 10.1016/j.funbio.2014.07.004

Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541-56. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

Lareen, A., Burton, F. & Schäfer, P., 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol. Biol.* 90:575–587. doi:10.1007/s11103-015-0417-8.

Levic, J., Ivanovi D., Stankov, S., Milivojevi??, M., Vukadinovi??, R., & Stepani??, A. (2013). Detection of *Rhizomucor pusillus* on sunflower seed. *Helia*, 36(59), 59–70. <https://doi.org/10.2298/HEL1359059L>.

Massomo, S. M. S., Mortensen, C. N., Mabagala, R. B., Newman, M. , Hockenhull, J. (2004). Biological control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv . *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathol.*, 152, 98–105. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2003.00808.x>.

Mercado-Blanco J, Bakker PAHM (2007) Interactions between plants and beneficial Pseudomonas spp: exploiting bacterial traits for crop protection. *A Van Leeuwen J Microb* 92:367. doi: 10.1007/s10482-007-9167-1.

Molinatto G, Puopolo G, Sonego P, Moretto M, Engelen K, Viti C, Ongena M, Pertot I (2016) Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499, a rhizobacterium that triggers plant defences and inhibits fungal phytopathogens. *J Biotechnol* 238:56-59. doi: org/10.1016/j.biote.2016.09.013.

Manjula K, Podile AR (2005) Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Indian J Exp Biol* 43:892-896.

Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S (2001) Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* 90:622-629. doi: org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.

Molinatto G, Puopolo G, Sonego P, et al. (2016) Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499, a rhizobacterium that triggers plant defences and inhibits fungal phytopathogens. *J. Biotechnol.* 238, 56-59. doi:10.1016/j.biote.2016.09.013.

Mutombo, K.M. (2009). Rapide évaluation de l'impact de la crise du secteur minier de la zone Lubumbashi-Likasi-Kolwezi de la province du Katanga (RD Congo) et des potentialités en terme de promotion de l'emploi ,La problématique agricole, Bureau International du Travail « BIT » avec l'autorisation n°06/860/CABMIN/MAF/KAT/2009 du Ministère Provincial des Mines et Affaires Foncières)

Munyuli ,M.T.(2002). Local inhabitants control strategies of crop pests in Eastern Democratic Republic of Congo , by exploiting the local plant. *Delpinoa*. 44, 65-74.

Mugo, S. N., Mwimali, M., Taracha, C. O., Songa, J. M., Gichuki, S. T., Tende, R., Hoisington, D. a. (2011). Testing public Bt maize events for control of stem borers in the first confined field trials in Kenya. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 4713–4718. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2702>.

Muyisa S. K., Kiremire B., Wasswa J., Mpiana P.T(2014).Dithiocarbamates Residues Level in Selected Vegetables from Bukavu, Democratic Republic of Congo. *J. phys. chem. sci.*, 1I3.:1-6

Munyuli bin M. T. 2000. Yield loss evaluation of sweet potato caused by leaf caterpillar, *Acraea acerata* Hew(Nymphalidae: Lepidoptera) in Kivu, Democratic Republic of Congo. *African Potato Association Conference Proceedings*, 5: 233 -236.

Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S (2001) Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity

against *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* 90:622-629. doi: org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x

Mercier, J., & Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 369–374. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.369-374.2000>

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. *Afr J Microbiol Res* 4:1135-1142.

Nihorimbere V, Cawoy H, Seyer A, Brunelle A, Thonart P, Ongena M (2012) Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol Ecol*. 79:176-191. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01208.

Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P. and Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 176-191. doi: org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x

Nihorimbere ,V., Fickers, P., Thonart, P.and Ongena , M. (2009) Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 124-130. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00017.x.

Nagorska K, Bikowski M, Obuchowskji M (2007) Multicellular behaviourand production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim Pol* 54:495-508.

Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., Viljoen, A. (2006). The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathol.* 55, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01344.x>.

Okigbo, R. N. (2003). Mycoflora of tuber surface of white yam (*Dioscorea rotundata* poir) and postharvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia*.156, 81–85. <https://doi.org/10.1023/A:1022976323102>.

Okigbo, R. N. (2005). Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia*. 159, 307–314. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-2454-8>.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202>

Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* 9:1084-1090. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x

Organisation Mondiale de la Santé and International centre for pesticide safety, mars 2004. Prévention des risques pour la santé liée à l'utilisation des pesticides dans l'agriculture, (http://www.who.int/occupational_health/publications/en/pwh1fr.pdf6/06/2016).

Pérez-García A, Romero D, de Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Curr Opin Biotechnol* 22:187–193. doi: org/10.1016/j.copbio.2010.12.003

Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347–375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.

Ralph N., O., & Maria I., O. (2003). Fungal Leaf Spot Diseases of Mango (*Mangifera indica L.*) in Southeastern Nigeria and Biological Control with *Bacillus subtilis*. *Plant Protect. Sci.*, 39, 70–77.

Richardson, A. E., Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol Bioch.* 156, 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>

Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., Ruíz-Saíz, J. E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett.* 272, 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761>.

Rostovic D., 2000. « Le maïs », dans : Romain H. Raemaekers, Agriculture en Afrique tropicale, Belgique. Ministère des Affaires étrangères, du commerce extérieur et de la coopération au développement, Direction générale de la coopération internationale (DGCI), 1 634 pages.

Ravensberg WJ (2015) Commercialization of microbes: present situation and future prospects In Lugtenberg B (ed) *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*,

Springer, Berlin, pp 309-317.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 56:845–857. doi: org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x

Sweets L, Wright S (2008) Compendium of Corn Diseases Corn diseases, University of Illinois at Urbana-Champaign , Dept. of Crop Sciences, 3rd Edition ISBN 978-0-89054-492-1

Silimela, M., Korsten, L. (2007). Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases. J Crop Prot. 26, 1474–1481. <https://doi.org/10.1016/j.croppro.2006.12.011>.

Thuita, M., Pypers, P., Herrmann, L., Okalebo, R. J., Othieno, C., Muema, E., & Lesueur, D. (2012). Commercial rhizobial inoculants significantly enhance growth and nitrogen fixation of a promiscuous soybean variety in Kenyan soils. Biol. Fertil. Soils.48, 87–96. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0611-z>

Trabelsi, D., Ben Ammar, H., Mengoni, A., & Mhamdi, R. (2012). Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. Soil Biol. Biochem.54, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.05.013>.

Touré Y, Onyewu 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. J Appl Microbiol 96:1151-1160. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02252

Tao, Y., Bie, X., Lv, F., Zhao, H. and Lu, Z. (2011). Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. J. Microbiol. 49, 146-50. doi: 10.1007/s12275-011-0171-9

Tang, Q., Bie, X., Lu, Z., Lv, F., Tao, Y. and Qu, X. (2014). Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. J. Microbiol. 52, 675-680. doi: 10.1007/s12275-014-3605-3

Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghota, S., Munshi, T. K., Balaram, P. and Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. J. Appl. Microbiol. 103, 2331-2339. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03501.x

Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J. and Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin

A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiol. Lett. 128, 101-106. doi: 10.1016/0378-1097(95)00090-R

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96, 1151-1160. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x

Tollens, E. (2003). L'état actuel de la sécurité alimentaire en R.D. Congo: Diagnostic et perspectives "Working Paper, n°77", Département d'Economie Agricole et de l'Environnement, Katholieke Universiteit Leuven, 48 pages

Tollens E (2003) Sécurité alimentaire à Kinshasa: un face à face quotidien avec l'adversité. Working Paper, n° 82, Département d'Economie Agricole et de l'Environnement, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 41pg

Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., & Hirata, A. (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. FEMS Microbiology Letters, 223(2), 287–292. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00399-9).

Tao, Y., Bie, X., Lv, F., Zhao, H. and Lu, Z. (2011). Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. J Microbiol. 49, 146–50. doi: 10.1007/s12275-011-0171-9

Tang, Q., Bie, X., Lu, Z., Lv, F., Tao, Y. and Qu, X. (2014). Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. J Microbiol. 52, 675–680. doi: 10.1007/s12275-014-3605-3.

Umunna, Opara Emma; Anselem, A. B. (2014). Control of Postharvest Rot of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* Lam.) Tuber in Vitro and in Vivo. Journal of Agriculture and Sustainability, 6(1), 50–68. Retrieved from <http://infinitypress.info/index.php/jas/article/view/831/399>.

Uma Maheswar N, Sathiyavani G (2012). Solubilization of phosphate by *Bacillus* sp. from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L.). J. chem. pharm. res. 4, 4007–4011. http://ials.gnu.ac.kr/gnuboard4/data/paper/20140911-10531248_4_27.pdf

Van Baarlen, P., Staats, M., & Van Kan, J. A. L. (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. Molecular Plant Pathology, 5(6), 559–574. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00253.X>

Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52, 487–511. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487

Wang, P., Guo, Q., Ma, Y., Li, S., Lu, X., Zhang, X. and Ma, P. (2015). DegQ regulates the production of fengycins and biofilm formation of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* NCD-2. *Microbiol Res.* 178, 42–50. doi: 10.1016/j.micres.2015.06.006

Walsh, C. T. (2014). Blurring the Lines between Ribosomal and Nonribosomal Peptide Scaffoldolds. *Acs Chem Biol.* 9, 1653–1661.

Wise, C., Falardeau, J., Hagberg, I. and Avis, T. J. (2014). Cellular Lipid Composition Affects Sensitivity of Plant Pathogens to Fengycin, an Antifungal Compound Produced by *Bacillus subtilis* Strain CU12. *Phytopathology.* 104, 1036–41. doi: 10.1094/PHYTO-12-13-0336-R

Xing, Y., Xu, Q., Yang, S. X., Chen, C., Tang, Y., Sun, S., Li, X. (2016). Preservation mechanism of chitosan-based coating with cinnamon oil for fruits storage based on sensor data. *Sensors,* 16(7), 274–302. <https://doi.org/10.3390/s16071111>

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q. and Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol.* 78, 5942–5944. doi: 10.1128/AEM.01357-12

Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A. and Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ Microbiol.* 16, 2196–2211. doi: 10.1111/1462-2920.12271