
Université de Lille
&
Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech

Thèse

Présentée par Aline LECONTE

Pour l'obtention du titre de :

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

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

Activité antifongique de lipopeptides de *Bacillus subtilis* sur une souche de *Venturia inaequalis* (tavelure du pommier) de sensibilité réduite aux triazoles : contribution à la compréhension du mode d'action

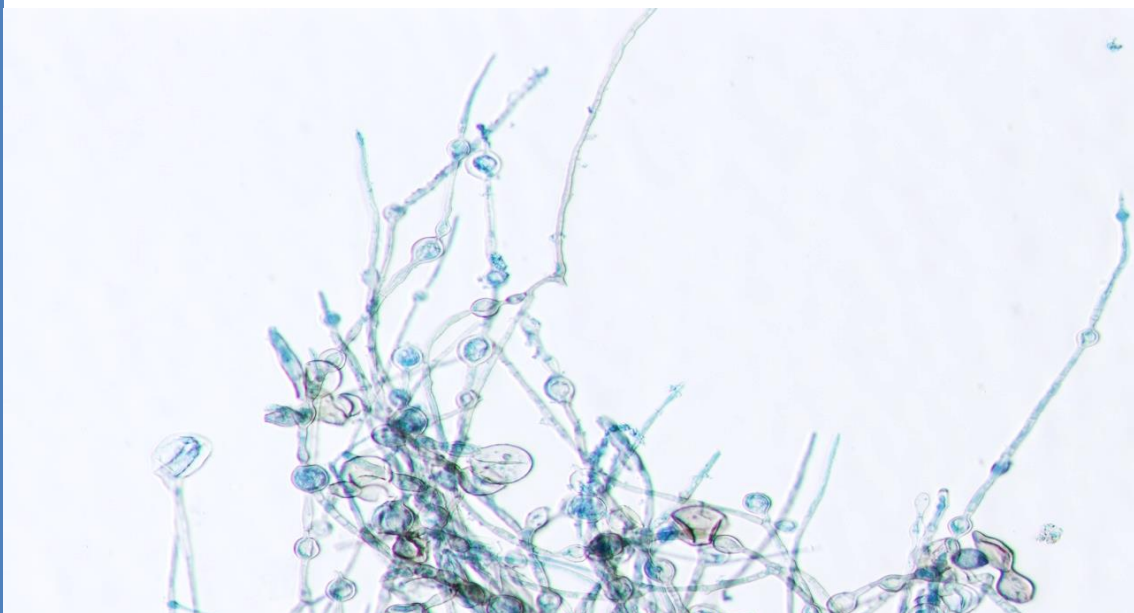
Préparée au sein de l'Unité Mixte de Recherche Transfrontalière BioEcoAgro
n°1158 à JUNIA ISA Lille, à l'Université de Lille et au TERRA Teaching and
Research Centre de l'Université de Liège Gembloux Agro-Bio Tech

Soutenue le 27 juin 2024 devant le Jury composé de :

François COUTTE	Université de Lille, France	Directeur
Philippe JACQUES	Université de Liège, Belgique	Directeur
Magali DELEU	Université de Liège, Belgique	Encadrante
Florence FONTAINE	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Rapporteuse
Bruno LE CAM	INRAE Angers, France	Rapporteur
Haïssam JIJAKLI	Université de Liège, Belgique	Examineur-Président
Maryline CALONNE	Université Catholique de Louvain, Belgique	Examinatrice
Déborah LANTEBERCQ	Haute Ecole Provinciale de Hainaut, Belgique	Examinatrice
Jérôme MUCHEMBLED	JUNIA – ISA Lille, France	Invité-Encadrant

Activité antifongique de lipopeptides de *Bacillus subtilis* sur une souche de *Venturia inaequalis* (tavelure du pommier) de sensibilité réduite aux triazoles : contribution à la compréhension du mode d'action

Aline LECONTE



Promoteurs :

Université de Lille, UMRT INRAE 1158 BioEcoAgro: Dr. François COUTTE

Université de Liège, UMRT INRAE 1158 BioEcoAgro: Pr. Philippe JACQUES

Co-encadrants :

JUNIA UMRT INRAE 1158 BioEcoAgro: Dr. Jérôme MUCHEMBLED

Université de Liège, UMRT INRAE 1158 BioEcoAgro: Dr. Magali DELEU

Année civile : 2024

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH
Et
UNIVERSITÉ DE LILLE (FRANCE)
SCIENCES TECHNOLOGIES (ST)

**Activité antifongique de lipopeptides de
Bacillus subtilis sur une souche de *Venturia
inaequalis* (tavelure du pommier) de
sensibilité réduite aux triazoles :
contribution à la compréhension du mode
d'action**

Aline LECONTE

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

Promoteurs :

Université de Lille, UMRt INRAE 1158 BioEcoAgro: Dr. François COUTTE

Université de Liège, UMRt INRAE 1158 BioEcoAgro: Pr. Philippe JACQUES

Co-encadrants:

JUNIA UMRt INRAE 1158 BioEcoAgro: Dr. Jérôme MUCHEMBLED

Université de Liège, UMRt INRAE 1158 BioEcoAgro: Dr. Magali DELEU

Année civile: 2024

Résumé

La lutte contre la tavelure du pommier due à *Venturia inaequalis*, une maladie préjudiciable, nécessite des alternatives aux fongicides chimiques conventionnels plus respectueuses de l'environnement. Une possibilité prometteuse est l'utilisation de lipopeptides produits par différentes espèces de *Bacillus*. Un des objectifs de ce travail a été d'évaluer l'efficacité de trois familles de lipopeptides (fengycines, iturines et surfactines) et de leurs mélanges pour lutter contre *V. inaequalis*, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ce travail s'est basé sur une souche de *V. inaequalis* sensible au tébuconazole (S755) et une souche ayant une sensibilité réduite au tébuconazole (Rs552) qui présente également une résistance différenciée à la fengycine. L'objectif a été d'approfondir la compréhension des mécanismes responsables de cette différence de sensibilité au tébuconazole et à la fengycine.

Contrairement à la fengycine, les lipopeptides de la famille des iturines ont une activité similaire sur les deux souches, alors que ceux de la famille des surfactines ne sont pas actifs, sauf en mélange binaire avec la fengycine. Les mélanges de fengycine/surfactine 50-50% et de mycosubtiline/surfactine 80-20% sont aussi efficaces que les lipopeptides seuls *in vitro*. A partir de ces mélanges, des essais en vergers ont montré une réduction significative de l'incidence de la tavelure pouvant aller jusqu'à 70%. Les différences de sensibilité de ces souches de *V. inaequalis* ont été investiguées en utilisant des techniques de biologie moléculaire, de microscopie et de lipidomique. Les résultats de ces travaux montrent que les différences de sensibilité aux triazoles entre les souches de *V. inaequalis* sont liées à des mécanismes moléculaires distincts, incluant la surexpression du gène *Cyp51A* et un efflux accru par des pompes membranaires chez la souche Rs552. Par ailleurs, ces mêmes mécanismes ne semblent pas impliqués dans la sensibilité réduite de la souche Rs552 à la fengycine. Les observations microscopiques indiquent des altérations cellulaires induites par celle-ci, suggérant une interaction avec les membranes plasmiques. Les analyses lipidiques révèlent quelques variations dans la composition en stérols et acides gras totaux ainsi qu'en phospholipides entre les souches, pouvant influencer leur sensibilité à la fengycine. En conclusion, l'efficacité potentielle des lipopeptides produits par *Bacillus* comme alternative aux fongicides chimiques dans la lutte contre la tavelure du pommier a été mise en lumière.

Mots clefs : *Venturia inaequalis*, *Bacillus* spp, tavelure du pommier, lipopeptides, triazoles, mécanismes de résistance.

Abstract

The fight against apple scab caused by *Venturia inaequalis*, a harmful disease, requires more environmentally friendlier alternatives to conventional chemical fungicides. One promising possibility is the use of lipopeptides produced by various *Bacillus* species. One of the objectives of this work was to evaluate the efficacy of three families of lipopeptides (fengycins, iturins and surfactins) and their mixtures in controlling *V. inaequalis*, both *in vitro* and *in vivo*. The project was based on a *V. inaequalis* strain sensitive to tebuconazole (S755) and a strain with reduced sensitivity to tebuconazole (Rs552), which also exhibit differential resistance to fengycin, with the aim of deepening the understanding of the mechanisms responsible for this difference in sensitivity to tebuconazole and fengycin.

Unlike fengycin, lipopeptides from the iturin family have a similar activity on both strains, while those from the surfactin family are not active, except in binary mixtures with fengycin. Mixtures of fengycin/surfactin 50-50% and mycosubtilin/surfactin 80-20% are as effective as individual lipopeptides *in vitro*. From these mixtures, orchard trials have shown a significant reduction in scab incidence of up to 70%. Sensitivity differences were investigated using molecular biology, microscopy and lipidomic techniques. The results of this work show that the differences in triazole sensitivity between *V. inaequalis* strains are linked to distinct molecular mechanisms, including overexpression of the *Cyp51A* gene and increased efflux by membrane pumps in the Rs552 strain. On the other hand, these same mechanisms do not appear to be involved in the reduced sensitivity of the Rs552 strain to fengycin. Microscopic observations indicate cellular alterations induced by fengycin, suggesting an interaction with plasma membranes. Lipid analyses reveal some variations in sterol and total fatty acid composition as well as phospholipids between strains, which could influence their sensitivity to fengycin. In conclusion, the potential effectiveness of lipopeptides produced by *Bacillus* as an alternative to chemical fungicides in the biocontrol of apple scab has been highlighted.

Key words: *Venturia inaequalis*, *Bacillus* spp, apple scab, lipopeptides, triazoles, resistance mechanisms.

Remerciements

Ce doctorat a eu lieu en cotutelle entre deux Universités, Lille et Liège, sur trois sites différents, JUNIA-ISA Lille, Gembloux AgroBioTech et Polytech-Lille. Cela représente de nombreuses rencontres, d'échanges, d'apprentissage mais aussi de remerciements.

Je souhaite, tout d'abord, remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir évalué l'ensemble du travail de ce doctorat. Je remercie les Professeurs Florence Fontaine et Bruno Le Cam pour l'évaluation et la correction de ce manuscrit. Je remercie également les Dr Maryline Calonne, Dr Déborah Lantebercq et Pr Haïssam Jijakli pour avoir accepté d'examiner ce travail et de leur participation au jury d'évaluation de la thèse.

Merci au Dr François Coutte et au Pr Philippe Jacques, mes directeurs de thèse, mais aussi au Dr Jérôme Muchembled et au Pr Magali Deleu, mes encadrants, pour m'avoir permis de réaliser ce doctorat. Merci pour ce que vous m'avez apporté scientifiquement durant ces trois ans. Merci à Jérôme pour avoir suivi le début de cette thèse et de m'avoir permis de bien débiter mais aussi pour la continuité. Merci à Philippe et Magali pour le suivi lors de mon arrivée à Gembloux. Enfin merci à François pour le suivi durant les trois ans et durant cette fin de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, au Pr Anissa Lounes-Hadj Sahraoui, au Dr Sonia Rippa et au Pr Marc Ongena pour leur suivi durant le doctorat, pour leur disponibilité et leurs conseils. Ces comités ont permis à ce travail d'être ce qu'il est aujourd'hui.

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'ISA. Merci au Pr Ali Siah pour m'avoir accueilli dans l'équipe PPB. Merci à mes collègues du bureau que j'ai côtoyé ces dernières années Justine, Ourida, Rémi, Morgane, Félicie, Florian et Marie. Merci également à Ali et Pauline pour leur aide en biologie moléculaire. Merci également à Caroline D et Justine pour leur aide au laboratoire. Merci à tous les doctorants avec qui j'ai pu échanger Marie-Astride, Claire, Rémi, Félicie, Florian, Marine. Merci également tous les membres du TRD ALS pour les moments partagés durant les pauses, surtout pour les gâteaux maison régulier.

Merci à mes amis gembloutois de m'avoir accueilli parmi vous. Merci à Marina, Margue, Cathy et Danielle d'être là pour tout le monde. Je remercie Alexis, Aurélien, Romain, Andrew, Sam, Rémi, Jelena, Sigrid, Andrea, Ikram, Adrien. Vous étiez tous présents pour m'aider à m'adapter ou quand j'en avais besoin. Un remerciement spécial pour Alexis, Aurélien et Romain avec qui j'ai passé de bons moments au travail comme chez les uns et chez les autres. Merci pour ces journées jeux pas assez nombreuses. Alexis j'arrive parmi les 1% comme promis.

Mes remerciements vont également aux personnes de Polytech. Merci à Antoine, Chloé, Angeline, Morgan, Pauline et Théo pour leur aide lors de mes passages à Polytech. Merci à Angeline et Morgan pour les discussions et leur soutien en fin de thèse. Je remercie également Matthieu pour son expertise en bio-informatique qui m'a permis d'avancer sur de nombreux résultats. Merci également à Valérie, Didier et alice pour leur accueil dans l'équipe MOM.

Je remercie également Anissa Lounes-Hadj Sahraoui pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Calais. Merci à Frédéric de m'avoir appris des techniques d'extraction et pour son expertise. Merci à la bonne humeur de votre laboratoire. Ravie d'avoir revu mon camarade de master Julien être comme chez lui parmi vous.

J'espère n'avoir oublié personne qui ait pu m'aider, discuter, partager de son savoir avec moi durant ce doctorat. Si c'est le cas, je m'en excuse de je vous dis merci également. Je remercie également toutes les stagiaires que j'ai pu côtoyé à JUNIA-ISA Lille, à Gembloux AgroBioTech et à Polytech-Lille.

Maintenant je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue durant ce doctorat. Tout d'abord ma seconde famille du badminton. Merci à François, Camille, Elise, Morgane, Romain, Tom J, Tom N, Benjamin, Baptiste, Logan, Michael, Kevin, Alex, et tant d'autres. Merci d'avoir été présents pour jouer, sortir, être compétitif, les anniversaires, pour tout. Ce travail est aussi pour vous et pour votre aide. Merci à Bruna et Camille pour votre aide en anglais. Merci à mon groupe de copine de promo, Faustine, Chloé, Louise, Constance et Emilie. Nous ne nous voyons pas souvent mais nos messages m'ont fait tellement de bien. Bon courage Chloé et Emilie, j'attends de lire votre thèse.

Je vais passer aux remerciements qui me tiennent particulièrement à cœur. Merci à ma famille (quelle soit belle ou de sang). Merci pour les journées noyées sous les neveux et nièces en votre présence Marie, Manue, Adrien et Arthur. Merci également à la meilleure jolie maman que je puisse avoir, pour ton écoute et ton soutien. Merci à mes frères, Etienne et Lucien qui même si on ne se montre pas souvent notre affection, ont été présents pour leur petite sœur. Et vous me l'avez souvent montré. Merci également à mes belles sœurs Camille et Camille (je vous laisse deviner qui est qui). Merci à mes grands parents encore présents ou non pour leur soutien même si vous ne comprenez pas grand-chose à part le mot pomme quand je vous explique le sujet. Enfin merci à mes parents, Agnès et Laurent, pour leur soutien indéfectible direct ou indirect. Merci pour l'accueil au labo ou à la maison de manière totalement aléatoire, pour les répétitions, les relectures, pour tout. Je vous dois beaucoup.

Enfin mes remerciements vont à Matthieu, mon soutien au quotidien et ma force. Ce doctorat a été un gros projet pour moi. Mais grâce à toi j'ai pu réaliser ce projet mais aussi nos projets en même temps. Merci pour ton dévouement pour nous et Anna. Merci à Anna, ma fille, mon rayon de soleil durant cette dernière année.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Remerciements	iii
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xvi
Liste des acronymes	xvii
Avant-propos	1
Chapitre 1	5
1. Le pathosystème pommier- <i>Venturia inaequalis</i>	7
1.1. Le pommier.....	7
1.2. <i>Venturia inaequalis</i>	8
2. Les traitements fongicides chimiques et résistances associées.....	13
2.1. Méthyl, Benzimidazole, Carbamates	13
2.2. Inhibiteurs externes de la quinone	14
2.3. Inhibiteur de la succinate déshydrogénase.....	14
2.4. Triazoles	14
2.5. Hypothèses pouvant expliquer la résistance aux triazoles.....	17
3. Structure d'une cellule fongique	18

3.1.	Généralités	18
3.2.	Composition et structure d'une cellule fongique	19
3.3.	La paroi cellulaire et la membrane plasmique	19
4.	Les lipopeptides de <i>Bacillus</i> , source de nouvelles solutions antifongiques..	22
4.1.	Généralités sur <i>Bacillus</i>	22
4.2.	Voie de biosynthèse des lipopeptides	23
5.	Objectifs de ces travaux de thèse	28
Chapitre 2		33
1.	Introduction	35
2.	Résumé des principaux résultats obtenus	36
3.	Assessment of lipopeptide mixtures produces by <i>Bacillus subtilis</i> as biocontrol products against apple scab (<i>Venturia inaequalis</i>)	39
Chapitre 3		63
1.	Contexte de la résistance aux triazoles chez la souche Rs552 de <i>V. inaequalis</i>	65
2.	Résumé des principaux résultats obtenus	66
3.	Deciphering the mechanisms involved in reduced sensitivity to azoles and fengycin lipopeptide in <i>Venturia inaequalis</i>	69
3.1.	Summary	70

3.2.	Introduction	71
3.3.	Materials and methods	73
3.4.	The results.....	84
3.5.	Discussion.....	100
3.6.	Conclusion	106
4.	Matériels et méthodes complémentaires.....	117
4.1.	Activité antifongique	117
4.2.	Observations microscopiques du mycélium	118
4.3.	Extraction et analyse des acides gras totaux par GC-MS	118
4.4.	Extraction et analyse des triglycérides par LC-MS	120
4.5.	Analyse statistique des lipides	121
5.	Résultats complémentaires	121
5.1.	Activité antifongique	121
5.2.	Observations microscopiques du mycélium	123
5.3.	Analyse quantitative des stérols totaux.....	128
5.4.	Analyse quantitative et qualitative des acides gras totaux.....	129
5.5.	Analyse quantitative des phospholipides totaux.....	131
5.6.	Analyse quantitative et qualitative des triglycérides par LC-MS	134

6. Discussion.....	137
6.1. Activités antifongiques <i>in vitro</i> au sein d'une même famille lipopeptidique	137
6.2. Observation des sphérules par microscopie	138
6.3. Analyse lipidomique	139
7. Conclusion.....	140
Chapitre 4	143
1. Effet des lipopeptides seuls <i>in vitro</i>	145
2. Effet des mélanges de lipopeptides <i>in vitro</i>	147
3. Effet des mélanges de lipopeptides <i>in vivo</i>	148
4. Résistance de <i>V. inaequalis</i> aux triazoles	151
5. Mode d'action des lipopeptides	153
6. Conclusion.....	155
Productions scientifiques.....	159
Bibliographie	161
Annexes	181

Liste des figures

Figure 1-1 : Cycle de vie de <i>Venturia inaequalis</i> (Bowen <i>et al.</i> , 2011).....	9
Figure 1-2 : Symptômes de la tavelure sur feuilles (A et B) et sur fruits (C et D) (Photos ephytia par M Giraud).	10
Figure 1-3 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol et action des triazoles (Godeau, 2023).....	15
Figure 1-4 : Schéma synthétique des hypothèses pouvant expliquer la résistance aux triazoles. A: mutation du gène <i>Cyp51</i> ; B: surexpression du gène <i>Cyp51</i> ; C: Surexpression des gènes codant les pompes à efflux.	16
Figure 1-5 : Structure d'une cellule fongique (Deacon, 2006). ER = réticulum endoplasmique ; G = appareil de Golgi ; M = mitochondrie ; N = noyau ; P = membrane plasmique ; S = septum ; V = vacuole ; W = paroi.....	19
Figure 1-6 : Structure de la paroi et de la membrane plasmique fongique (Mycoses Study Group Education and Research Consortium, 2014).....	20
Figure 1-7 : Structure membranaire en présence d'un radeau lipidique (Ripa <i>et al.</i> , 2021).....	21
Figure 1-8 : Représentation de la structure chimique de de chaque famille de lipopeptides produits par <i>B. subtilis</i> : fengycine, mycosubtiline et surfactine (Desmyttere <i>et al.</i> , 2019).	23
Figure 1-9 : Représentation schématique d'une NRPS, permettant l'assemblage de trois peptides (A = domaine d'adénylation ; T = domaine de thiolation ; C = domaine de condensation ; Te = domaine thioestérase ; Mm = monomère) (Vassaux, 2019).24	
Figure 1-10 : Schéma des objectifs. 1, analyse des activités antifongiques de mélanges lipopeptidiques <i>in vitro</i> et en verger ; 2, caractérisation génétique et biochimique de la sensibilité réduite de Rs552 ; 3, activités antifongiques <i>in vitro</i> des lipopeptides par famille ; 4, analyse lipidomique des souches S755 et Rs552.....	30
Figure article 1-1 : Schematic representation of scientific strategy developed in this work. Step 1: <i>in vitro</i> screening of the best lipopeptide mixture against <i>V. inaequalis</i> ; Step 2: Optimization of the lipopeptide mixture production; Step 3: Production and purification of the different mixtures of lipopeptides in shaken flask; Step 4: Study of lipopeptide mixture efficiency against <i>V. inaequalis</i> in organic orchards; Step 5: Lipopeptide remanence evaluation using QuEChERS method.	41
Figure article 1-2 : Effect of the lipopeptide ratios (w/w) on the IC ₅₀ of fengycin/surfactin mixtures on <i>V. inaequalis</i> S755 strain. IC ₅₀ in logarithmic scale.	48
Figure article 1-3 : Effect of the lipopeptide ratios (w/w) on the IC ₅₀ of mycosubtilin/surfactin mixtures on <i>V. inaequalis</i> S755 strain. Logarithmic scale. ..	48
Figure article 1-4 : Pareto diagram of normalized effect for fengycin concentration, surfactin concentration, specific production of fengycin and specific production of surfactin, biomass production and percentage of fengycin produced in relation to total	

lipopeptides produced. A: carbon source; B: Nitrogen source; C: Phosphate concentration; D: K_{La}. 49

Figure article 1-5 : Interaction diagrams for (A) fengycin specific production, (B) surfactin specific production and for (C) Percentage of fengycin produced related to total lipopeptides. * indicates the interaction between the factors. 51

Figure article 1-6 : Graphical representation of the levels of leaf scab contamination in the different modalities following the 2018 trials at the end of primary contamination. The different statistical groups are represented by the letters A and B. A rating of AB indicates that this modality belongs statistically to groups A and B. 53

Figure article 1-7 : Graphical representation of the levels of leaf scab contamination in the different modalities following the 2019 trials at the end of primary contamination. The different statistical groups are represented by the letters A and B. A rating of AB indicates that this modality belongs statistically to groups A and B. 54

Figure article 2-1 : Schematic representation of the research strategy. 1: Study of the antifungal activity of lipopeptide and triazole; 2: Microscopic analysis; 3: Search for mutations in the *CYP51A* gene; 4: Analysis of *CYP51A* by docking and dynamics; 5: Study of *CYP51A* expression; 6: Study of efflux pumps; 7: Lipids analysis. 73

Figure article 2-2 : Acetonitrile (ACN) gradient used for lipopeptide purification. A, gradient for purification of iturin A; B, gradient for purification of lichenysin and pumilacidin; C, gradient for purification of fengycin and mycosubtilin. 76

Figure article 2-3 : DNA extraction and purification protocol for *V. inaequalis* S755 and Rs552. 80

Figure article 2-4 : Temperature program for sterol GC-MS analysis. 84

Figure article 2-5 : Lipopeptide analysis and antifungal activity against the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Antifungal activity of five lipopeptides (fengycin, mycosubtilin, iturin A, surfactin, lichenysin, pumilacidin), four binary mixtures of them (fengycin-iturin A, fengycin-lichenysin, fengycin- pumilacidin), and two azole fungicides (tebuconazole and tetraconazole) against S755 and Rs552. Bars with different letters indicates a significant difference according to ANOVA two factor -Tukey test at $P \leq 0.05$. **B**, Molecular structures of the assessed lipopeptides, with a description of the peptide moiety and the fatty acid chain. 87

Figure article 2-6 : Observations of the mycelium of both *V. inaequalis* strains S755 and Rs552 using photonic (A-F) and transmission electron microscopy (G-L). **A**, S755 control; **B**, Rs552 control; **C**, S755 at 0.66 mg/L fengycin; **D**, Rs552 at 0.66 mg/L fengycin; **E**, S755 at 0.66 mg/L fengycin; **F**, Rs552 at 42 mg/L fengycin. cw, cell wall; pm, plasma membrane; cy, cytoplasm. 89

Figure article 2-7 : Structural and *in silico* functional analysis of *CYP51A* in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Alignment of the obtained *Cyp51A* nucleotide sequences. Ent27, myclobutanil sensitive strain (AAC#AF227920) (Schnabel and Jones, 2001); Ent54, myclobutanil resistant strain (ACC# AF262756)

(Schnabel and Jones, 2001); Rs552, azole reduced sensitivity strain (ACC#OR909970); S755: azole sensitive strain (ACC#OR909969). **B**, Alignment of the obtained *Cyp51A* amino-acid sequences. **C**, Sequence alignment of *5eac* (*S. cerevisiae* CYP51 enzyme) and *Ent54* (*V. inaequalis* CYP51 enzyme from the strain Ent54). Residues involved in the heme binding are encased in red. **D**, Model of CYP51A in *V. inaequalis*, with position of the CYP51A S183C substitution (in green). The helices are depicted in magenta, β sheets in yellow, the heme in orange, and tebuconazole in blue. **E**, Position of Ser 183 and Cys 492 in CYP51A. **F**, Differences of interaction between the serine bearing Rs552 (red) and the cysteine bearing S755 (blue). The interactions shown are present 80% or more of the simulation time.92

Figure article 2-8 : Expression of the *Cyp51A* gene and sequence analysis of the *Cyp51A* upstream region (putative promoter) in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Relative *Cyp51A* expression in S755 and Rs552 in presence or absence of tebuconazole or fengycin. The presence of different letters in each molecule indicates a significant difference among the two strains according to the ANOVA-Tukey test at $P=0.05$. **B**, Simplified scheme of the *Cyp51A* upstream region alignment. Grey, conserved sequence; yellow, 499 bp insertion cut in two segments by 613 bp insertion; blue, 613 bp insertion; green, deleted sequence; orange, single nucleotide polymorphism. **C**, DNA-binding motif for transcription factors from MEME Suite (Bailey and Elkan, 1994). **D**, Position of DNA-binding motifs in the *Cyp51A* upstream region of S755 and Rs552. **E**, DNA-binding motifs obtained by MEME suite. **F**, DNA-binding motif positioning obtained by MEME suite in S755 and Rs552.95

Figure article 2-9 : Biochemical and genetic analysis of efflux pumps in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Interaction ratios (IRs) between efflux pump modulators (amitriptyline, chlorpromazine, verapamil) and tebuconazole (a), fengycin (b), and tolnaftate (c). The used concentrations of fungicides are close to the IC_{50} value obtained for each strain. Synergy is indicated by bold IR values. The interaction between fungicides and EPMs was considered additive when $0.5 < IR < 1.5$, synergistic when $IR \geq 1.5$, or antagonistic when $IR \leq 0.5$ (Leroux and Walker, 2013). **B**, Number of silent and non-silent mutations found in the ABC- and MFS-encoding genes in S755 and Rs552.96

Figure article 2-10 : Comparison of the relative composition of both total sterols and total phospholipids in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Relative composition (%) comparison of total sterol derivatives. **B**, Relative composition (%) comparison of different classes of phospholipids: phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylethanolamine (PE), and lysophosphatidylethanolamine (LPE); **C**, Comparison of the relative composition (%) of PI; **D**, Relative composition (%) comparison of LPC; **E**, Comparison of the relative composition (%) of LPE. Bars represent means and error bars standard deviation. The presence of letters indicates a significant difference among the two strains according to the ANOVA one factor – Tukey test (with a α adjusted to = 0.007); $n=3$99

Figure 3-1 : Protocole d'activité antifongique *in vitro* des lipopeptides et des triazoles contre *V. inaequalis*..... 117

Figure 3-2 : Représentation du protocole d'extraction des stérols et des acides gras. A : saponification direct ; B : extraction des stérols ; C : extraction des acides gras. 119

Figure 3-3 : Activité antifongique de six lipopeptides (fengycine, mycosubtiline, iturine A, surfactine, lichénysine, pumilacidine), de quatre de leurs mélanges binaires (fengycine-iturine A, fengycine-surfactine, fengycine-lichénysine, fengycine-pumilacidine) et de deux substances actives de la famille des triazoles (tébuconazole et tétraconazole) contre S755 et Rs552. Les barres, représentant les moyennes estimées, avec des lettres différentes indiquent une différence significative selon ANOVA 2 facteurs - Tukey test) à $P \leq 0.05$ 122

Figure 3-4 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 0,021 mg/L fengycine ; D, Rs552 à 42 mg/L fengycine ; E et E', Zoom sur les vésicules observées dans l'image C (rectangle) ; F, Zoom sur le mycélium observé dans l'image D (rectangle). 124

Figure 3-5 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 0,014 mg/L tébuconazole ; D, Rs552 à 0,88 mg/L tébuconazole ; E, S755 à 0,014 mg/L tétraconazole ; F, Rs552 à 0,88 mg/L tétraconazole ; G, S755 à 1,313mg/L mycosubtiline ; H, Rs552 à 1,313 mg/L mycosubtiline ; I, S755 à 2,625 mg/L iturine A ; J, Rs552 à 2,625 mg/L iturine A..... 125

Figure 3-6 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 21 mg/L surfactine ; D, Rs552 à 21 mg/L surfactine ; E, S755 à 42 mg/L lichénysine ; F, Rs552 à 42 mg/L lichénysine ; G, S755 à 42 mg/L pumilacidine ; H, Rs552 à 42 mg/L pumilacidine..... 126

Figure 3-7 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 0,041 mg/L FS ; D, Rs552 à 42 mg/L FS ; E, S755 à 2,625 mg/L FP ; F, Rs552 à 5.25 mg/L FP ; G, S755 à 1,313 mg/L FL ; H, Rs552 à 10,5 mg/L FL. I, S755 à 0,082 mg/L FI ; J, Rs552 à 1,313 mg/L FI. FS, fengycine-surfactine ; FP, fengycine-pumilacidine ; FL, fengycine-lichénysine ; FI, fengycine-iturine A. 127

Figure 3-8 : Comparaison de la quantité des différents types de stérols chez les deux souches S755 et Rs552 de *V. inaequalis*. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. L'absence de lettre indique l'absence de différence significative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$ 129

Figure 3-9 : Comparaison de la quantité (A) et de la composition relative (%) (B) des acides gras totaux chez les deux souches S755 et Rs552 de *V. inaequalis*. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence de lettres indique une différence significative entre les deux souches selon

les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$130

Figure 3-10 : Comparaison de la quantité de chaque classe de phospholipides totaux chez les deux souches de *V. inaequalis*. Phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidyléthanolamine (PE) et lysophosphatidyléthanolamine (LPE). Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. L'absence de lettres indique l'absence d'une différence significative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$131

Figure 3-11 : Comparaison de la composition quantitative des phospholipides totaux dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, Comparaison de la composition quantitative du phosphatidylcholine (PC). B, Comparaison de la composition quantitative du lysophosphatidylcholine (LPC). C, Comparaison de la composition quantitative du lysophosphatidyléthanolamine (LPE). D, Comparaison de la composition quantitative du phosphatidylinositol (PI). Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence ou l'absence de lettres indique une différence significative ou non entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$133

Figure 3-12 : Comparaison de la quantité et de la composition relative (%) des triglycérides (TG) dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, Comparaison de la composition quantitative TG totaux. B, Comparaison de la composition relative (%) des TG totaux. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence ou l'absence de lettres indique une différence significative ou non entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$135

Figure 3-13 : Comparaison de la composition quantitative et relative des triglycérides (TG) pour une chaîne d'acide gras dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, Comparaison de la composition quantitative TG. B, Comparaison de la composition relative des TG. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence ou l'absence de lettres indique une différence significative ou non entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$136

Liste des tableaux

Table article 1-1 : Lipopeptides used in this study, their ratios and purity.....	42
Table article 1-2: Summary of the modalities studied against apple scab in 2018.	44
Table article 1- 3 : Summary of the modalities studied against apple scab in 2019.	45
Table article 1-4 : Quantification of fengycin, surfactin and mycosubtilin following extraction by the QuEChERS method in the different samples by RP-UPLC-MS..	54
Tableau 3-1: Temps de rétention des différents lipides analysés par GC-MS. ..	120
Tableau 3-3 : Effets de l'augmentation de la concentration de lipopeptide sur la présence ou l'absence de sphérules chez les deux souches de <i>V. inaequalis</i>	128

Liste des acronymes

°C: degré Celsius

a: adénine

A: alanine

ABC: ATP Binding Cassette

ADN: Acide DesoxyriboNucléique

ADNc: Acide DesoxyriboNucléique Complémentaire

AG: Acides Gras

ANOVA: Analyse de la Variance

Arg, R: arginine

ARN: Acide RiboNucléique

Asn, N: Asparagine

Asp, D: Acide aspartique

BHT: Hydroxytoluène butylé

c: cytosine

CHCl₃: chloroforme

CI₅₀: Concentration Inhibitrice médiane

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

Ct: seuil du cycle

CYP51: C14 α -déméthylase

cyp51A: Cytochrome P450 famille 51 sous famille A

Cys, C: cystéine

DMI: DeMethylation Inhibitors

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

DNase: DésoxyriboNucléase

dNTP: désoxyriboNuclétide TriPhosphate quelconque

DO: Densité Optique

Eau PPI: eau pour PréParation Injectable

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

EPM: Efflux Pumps Modulators

F: Fengycine

FiD: Flam ionisation Detector

g: gramme

g: guanine

GC-MS: Gas Chromatography–Mass Spectrometry

GOMo: Gene Ontology for Motifs

h: heure

ha: hectar

HCl: Acide chlorhydrique

I: Iturine A

IDM: Inhibitor DeMethylation

IFT: Indice de Fréquence de Traitements

Ile, I: isoleucine

IR: Interaction Ratio

ISR: Induced Systemic Resistance

kb: kilobase

kDa: kilodalton

kg: kilogramme

L: Lichénysine

L: litre

LC-MS: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

LPC: LysoPhosphatidylCholine

LPE: LysoPhosphatidulEthanolamine

LSI: Lipidomics Standard Initiative

Lys, K: lysine

M: molaire

M: Mycosubtiline

M1: 1^{ère} methionine de la protéine

MAST: Motif Alignement and Search Tool

MBC: Méthyle, Benzimidazole, Carbamates

MDR: MultiDrug Resistant

MEME suite : Multiple Em for Motif Elicitation suite

Met, M: méthionine

MFS: Major Facilitator Superfamily

mg: milligramme

MgCl₂: chlorure de magnesium

Mha: Million d'hectars

min: minute

mL: millilitre

mm: millimètre

mM: millimolaire

MPE: Modulateur de Pompes à Efflux

Mt: Million de tonnes

ng: nanogramme

NRPS: Non Ribosomal Peptide Synthetase

p/p: poids par poids

P: Pumilacidine

pb: paire de base

PC: PhosphatidylCholine

PCR: Polymerase Chain Reaction

PE: PhosphatidylEthanolamine

PG: PhosphatidylGlycérol

pH: potentiel Hydrogène

Phe, F: phénylalanine

PI: PhosphatidylInositol

PKS: PolyKetide Synthase

PMSF: fluorure de phénylméthylsulfonyl

Pro, P: proline

PS: PhosphatidylSérine

QoI: Quinone outside Inhibitors

QTL: Quantitative Trait Loci

RI: Rapport d'Interaction

ROS: Reactive Oxygen Species

rpm: Rotation Par Minute

Rs552 : souche de *Venturia inaequalis* ayant une sensibilité réduite aux triazoles

RT: Reverse Transcriptase

RT-qPCR: Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S: Surfactine

S755 : souche de *Venturia inaequalis* ayant une sensibilité aux triazoles

SDH: Succinate DeHydrogénase

SDHI: Succinate DeHydrogenase Inhibitors

sec: seconde

Ser, S: sérine

SINAPs: Structural Interaction Network Analysis Protocols

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SREBP: Sterol-Regulatory Element Binding Protein

t: thymine

TEM: Transmission Electronic Microscopy

TG: TriGlycérides

Thr, T: thréonine

Tyr, Y: tyrosine

UPC2: sterol Uptake Control Protein 2

Val, V: valine

μL: microlitre

μm: micromètre

μM: micromolaire

Avant-propos

Une des productions les plus traitées par les pesticides est la production de pommes. Les productions sont traitées pour des raisons biologiques (protection dès le stade floral) de la plante. En effet, la culture de la pomme est à la fois la cible de maladies fongiques (oïdium, tavelure, ...) mais aussi de ravageurs (acarien, carpocapse, tordeuse orientale, ...). Pour lutter contre ces bio agresseurs, en production conventionnelle, les producteurs peuvent utiliser de 20 à 40 traitements pesticides par an. Dans le cadre d'une culture biologique, ils peuvent utiliser de 8 à 12 traitements autorisés en agriculture biologique. Mais ces traitements posent des problèmes : pollutions des sols et des eaux, apparition de résistances, effets nocifs sur la santé des utilisateurs ou encore la diminution de la biodiversité. La maladie causant le plus de pertes économiques, pour la production des pommes, est la tavelure du pommier. Le champignon responsable de cette maladie est *Venturia inaequalis*. La tavelure cause des symptômes au niveau des fruits et des feuilles qui sont des parties sensibles lors de leur croissance. Les symptômes sur les fruits sont visibles par des tâches noires ce qui rend les fruits invendables. Une des familles de pesticides la plus utilisée contre la tavelure est celle des triazoles. Cette famille fait partie du groupe des demethylation inhibitors (DMI). Ce groupe vise la biosynthèse des stérols au niveau des membranes du champignon. Actuellement, il existe de nombreux plans pour réduire l'utilisation des pesticides mais aussi pour trouver des alternatives. Les plans Ecophyto I et II, le plan Bio, le rapport Agriculture et innovation 2025, par exemple, cherchent à répondre à ces objectifs. Un moyen pour cela est le biocontrôle. Il s'agit d'utiliser des moyens d'origine biologique (organismes ou produits dérivés des organismes). Les lipopeptides produits par différentes espèces de *Bacillus* pourraient être un moyen pour lutter contre la tavelure du pommier. Les lipopeptides sont des métabolites secondaires principalement microbiens. Ils sont biodégradables, potentiellement moins toxiques que les pesticides de synthèse et certains ont démontré des propriétés fongicides et de stimulation de mécanismes de défense des plantes. Ils pourraient donc être un substitut partiel ou total aux fongicides actuels.

Des expériences réalisées *in vitro* par Desmyttere *et al.* (2019) ont permis de démontrer la capacité de certains lipopeptides tels que la fengycine, la mycosubtiline et la surfactine à inhiber la germination des spores de *V. inaequalis*. Elles ont également mis en évidence l'activité antifongique de mélanges de lipopeptides tels que surfactine/fengycine et surfactine/mycosubtiline et une activité différenciée de la fengycine vis-à-vis de deux souches de *V. inaequalis* présentant une sensibilité différente au tébuconazole. Dans le cadre d'un projet régional, AgriBioPOM, l'efficacité de mélanges de lipopeptides a pu être évalué en verger.

Pour poursuivre ces travaux, la thèse a cherché à expliquer le lien potentiel entre la sensibilité réduite aux triazoles d'une souche de *V. inaequalis* et sa résistance à la fengycine. Dans cette optique, différentes analyses génétiques concernant la séquence et la régulation du gène *Cyp51* dont le produit est la cible des triazoles et différentes

analyses biochimiques relatives aux pompes à efflux et à la composition lipidique des souches ont été réalisées. Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre la France (Junia Lille, l'Université de Lille) et la Belgique (l'Université de Liège Gembloux AgroBioTech) mettant en collaboration plusieurs équipes de l'Unité Mixte de Recherche Transfrontalière BioEcoAgro : l'équipe 4 « Métabolites secondaires d'origine microbienne » et l'équipe 5 « Métabolites spécialisés d'origine végétale ».

Chapitre 1

Introduction bibliographique

1. Le pathosystème pommier-*Venturia inaequalis*

1.1. Le pommier

1.1.1. Généralités sur le pommier

Le pommier, appartenant au genre *Malus* de la famille des Rosacées, est un arbre fruitier qui occupe une place de choix parmi les espèces végétales d'importance économique (Korban, 2021). Il partage cette distinction avec d'autres membres de la famille, tels que l'abricotier et le cerisier. Dans le vaste genre *Malus*, on recense environ une soixantaine d'espèces botaniques à travers le monde, parmi lesquelles la plus notable est *Malus domestica* (Korban, 2021). *M. domestica* domine la scène de la production de pommes, avec une incroyable diversité de plus de 10 000 variétés (Juniper and Mabberley, 2006; Cornille *et al.*, 2013), bien que la majeure partie de la production mondiale soit concentrée sur une poignée de variétés bien connues telles que 'Fuji', 'Delicious', 'Golden Delicious', 'Gala', 'Granny Smith', 'Jonagold', 'Elstar' et 'McIntosh' (Brown, 2012).

1.1.2. Domestication

Le pommier, *M. domestica*, a un passé enraciné dans les montagnes du Tian Shan en Asie centrale et il trouve ses origines dans une espèce sauvage étroitement liée, le *Malus sieversii* (Velasco *et al.*, 2010; Cornille *et al.*, 2013). Avant même l'intervention humaine, des animaux de cette région, tels que les ours et les chevaux, ont probablement joué un rôle dans la sélection de fruits plus gros et plus sucrés (Spengler, 2019; Yao *et al.*, 2015). Par la suite, la sélection effectuée par les humains a continué à affiner ces caractéristiques lors de la domestication du *Malus domestica* (Khan *et al.*, 2014). L'introduction du pommier en Europe, il y a environ 3000 à 4000 ans, grâce aux échanges de graines le long de la Route de la Soie, a marqué le début de son influence mondiale (Juniper and Mabberley, 2006; Cornille *et al.*, 2013). Des études génétiques ont également révélé que divers événements d'hybridation avec des espèces sauvages locales, notamment le *Malus sylvestris* et le *Malus orientalis*, se sont produits le long de la Route de la Soie, contribuant ainsi à la diversification du pommier (Cornille *et al.*, 2019, 2012). En fait, il est estimé que jusqu'à 23% du génome de la variété Gala provient d'hybridation (Sun *et al.*, 2020). Ce mélange complexe d'histoire naturelle et d'intervention humaine a façonné l'arbre fruitier que nous connaissons aujourd'hui en tant que *M. domestica*.

1.1.3. Economie

La pomme est le deuxième fruit le plus cultivé au monde avec une surface de vergers de 4,8 Mha et 93,1 Mt de pommes produites en 2021 (FAOSTAT, 2021). La valeur de la production mondiale représentait 44 milliards de dollars en 2021 (FAOSTAT, 2021). En Belgique la production est de 250 000 tonnes pour une surface de 5 350 ha (FAOSTAT, 2021). En France, la production annuelle est de 1,6 Mt, pour une surface

de production représentant 54 210 ha en 2021. Parmi ces chiffres, la région Hauts-de-France représente environ 4% de la production et de la surface nationale (Agreste, 2020). La pomme reste le fruit préféré des Français. Pouvant être commercialisée en tant que fruit frais ou comme produit transformé (compote, jus, cidre, ...) elle représente un marché important de l'économie en France. Cependant, la production entre 2020 et 2021 a diminué de 7%. La principale menace conduisant à cette diminution sont les ravageurs et les pathogènes tels que les pucerons cendrés (*Dysaphis plantaginea*), le feu bactérien (*Erwinia amylovora*), l'oïdium (*Podosphaera leucotricha*) ou encore la tavelure (*Venturia inaequalis*). Ce dernier pathogène étant le plus dommageable.

1.2. *Venturia inaequalis*

1.2.1. Généralités sur *Venturia inaequalis*

Venturia inaequalis (*Fusicladium pomi*) est un champignon ascomycète haploïde et hémibiotrophe à thalle filamenteux (Bowen *et al.*, 2011). Avant 2011, *V. inaequalis* était classé chez les Pleosporale (Lumbsch and Huhndorf, 2007). Après 2011, il est classé dans un nouvel ordre : les Venturiales (Zhang *et al.*, 2011). Le génome fait entre 46 et 73 millions pb ("*Venturia inaequalis* (ID 49733) - Genome - NCBI"). Ce champignon est responsable de la tavelure du pommier.

1.2.2. Cycle de vie – symptomatologie

Le cycle de vie de *V. inaequalis* se décompose en deux phases : une phase sexuée et une phase asexuée (Figure 1.1). La phase sexuée est représentée par le cycle extérieur de la Figure 1.1. La phase sexuée est responsable de la production d'un inoculum primaire sous la forme d'ascospores contenues dans des asques à l'intérieur de pseudothèces (ascocarpe). Ces pseudothèces sont la forme de conservation hivernale. Au printemps, les ascospores sont produites, et une fois mures, sont éjectées dans l'air durant une pluie ou une rosée (pic d'éjection) pour ensuite être dispersées par le vent et la pluie (Leroy *et al.*, 2013; MacHardy *et al.*, 2001). Si les conditions sont favorables (relation étroite entre humectation et température) les ascospores vont germer et former un mycélium quand elles se seront déposées sur la plante. Les conditions favorisant la germination de *V. inaequalis* font intervenir la température et l'hygrométrie (Schumacher *et al.*, 2008; Turner, 1986), avec une température ambiante pouvant varier (optimum entre 15 et 22°C). Les feuilles doivent rester humides un temps suffisamment long. L'automne est le moment propice pour *V. inaequalis* pour se reproduire sexuellement et poursuivre son infection primaire.

La phase asexuée est estivale. Elle débute avec la production de conidies (inoculum secondaire) produites par un stroma mycélien sous cuticulaire se développant sur les feuilles et les jeunes fruits infectés. Plusieurs cycles asexués s'enchainent en fonction des conditions environnementales et constituent la phase épidémique de la maladie. Les conidies sont dispersées par la pluie et le vent pour se déposer sur d'autres feuilles

et/ou d'autres fruits causant de nouvelles infections (taches) (Bowen *et al.*, 2011; Carisse and Jobin, 2006).

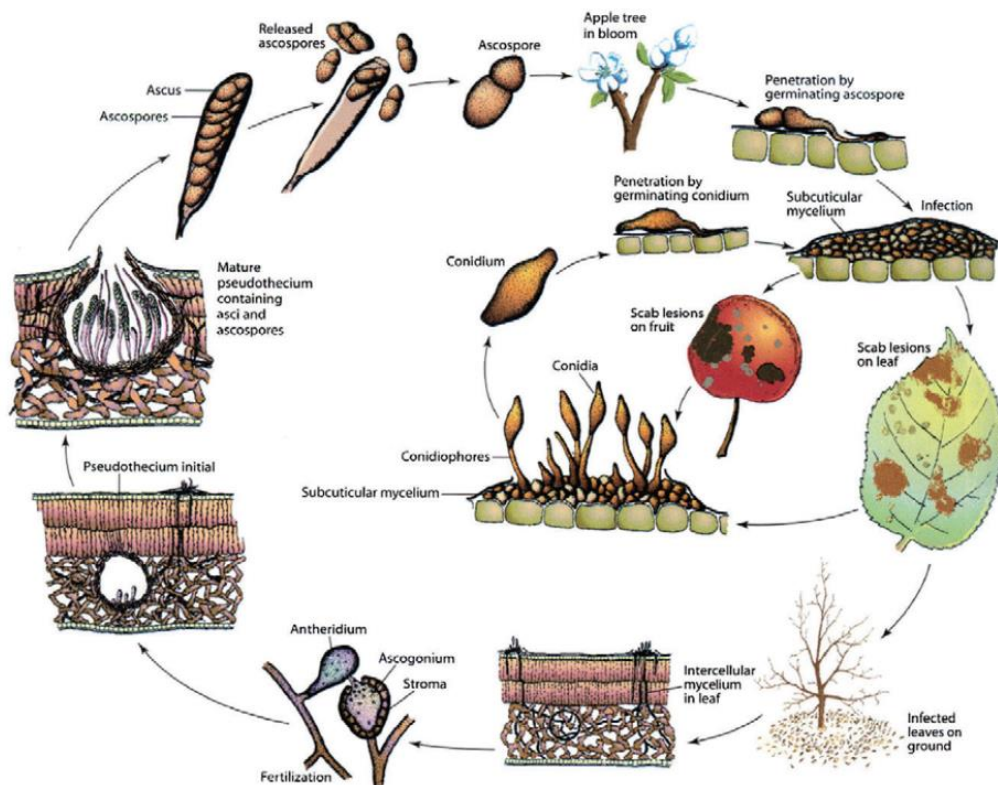


Figure 1-1 : Cycle de vie de *Venturia inaequalis* (Bowen *et al.*, 2011).

Les symptômes de la tavelure du pommier se manifestent principalement au niveau des fruits et des feuilles. Ces parties sont particulièrement sensibles lors de leur croissance (Carisse and Jobin, 2006). Les symptômes vont être la présence de taches foncées. Dans un premier temps, les lésions sur feuilles vont d'abord être isolées puis elles peuvent s'étendre à l'ensemble de la feuille et parfois la recouvrir complètement (Figure 1-2A et B). Au début, l'infection se trouve sur la face supérieure des feuilles. A la fin de la saison de l'infection, les taches se retrouvent sur les faces supérieures et inférieures. Les lésions vont évoluer au fur et à mesure du temps. Elles seront de petites tailles circulaires et diaphanes puis elles vont s'agrandir et avoir une couleur brun à noir. Les feuilles étant très infectées, elles finiront par tomber dû au dessèchement et à la déformation (Roubal, 2017). Pour les fruits, les taches sont identiques aux feuilles (Figure 1-2C et D). Avec la croissance du fruit la zone nécrosée peut se fendre. Ces altérations rendent le fruit inesthétique à la consommation humaine ce qui les rend invendables. La tavelure n'est pas toxique pour la consommation humaine mais elle cause des pertes économiques importantes. Pour

lutter contre *V. inaequalis* et les autres bio-agresseurs, des méthodes de lutttes agronomiques peuvent être mises en place.

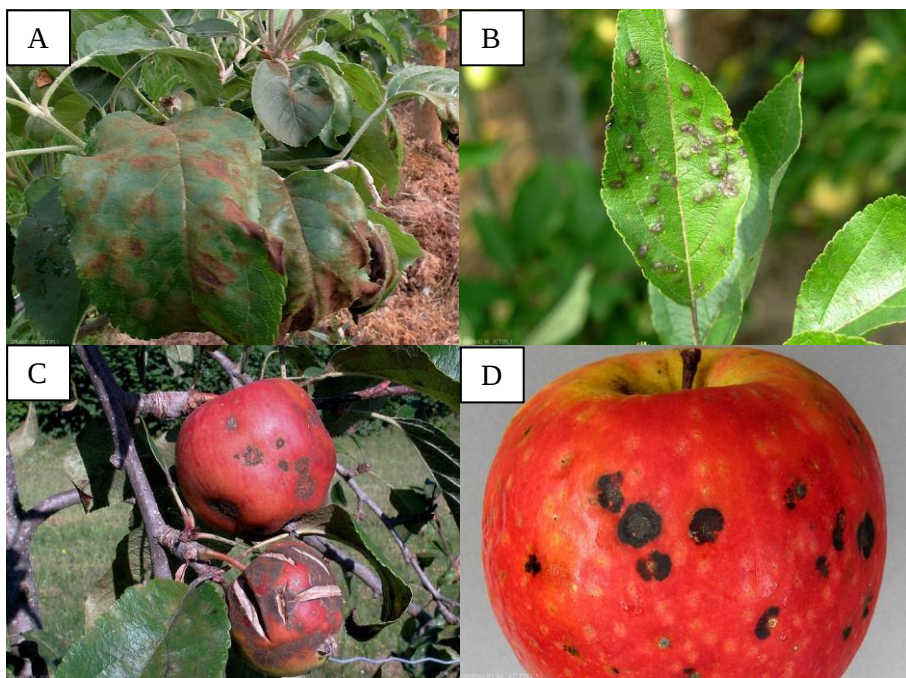


Figure 1-2 : Symptômes de la tavelure sur feuilles (A et B) et sur fruits (C et D)
(Photos ephytia par M Giraud).

1.2.3. Moyens de lutttes agronomiques contre *V. inaequalis*

1.1.2.3.1. Lutte variétale

La lutte variétale joue un rôle essentiel dans la gestion durable de la tavelure du pommier. Les avancées récentes dans la compréhension des mécanismes de résistance ont permis la création de variétés capables de maintenir des rendements élevés malgré une pression pathogène élevée (Brun *et al.*, 2007). Bien que certaines variétés soient hautement tolérantes, aucune n'est totalement résistante (Cazenave, 2022). La résistance peut se manifester de deux manières : quantitative, impliquant la contribution de plusieurs gènes de résistance, et qualitative, basée sur un gène spécifique (Benejam, 2021). La résistance qualitative est apportée par un gène majeur de résistance permettant la résistance totale de la plante à un agent phytopathogène, comme *V. inaequalis* (Benejam, 2021). La résistance quantitative va combiner l'effet de plusieurs gènes pour permettre à la plante d'avoir un niveau de défense suffisant (Benejam, 2021).

Concernant certaines variétés, comme Ariane (possédant le gène majeur *Rvi6*), bien que très tolérantes, peuvent présenter des caractéristiques indésirables telles que l'épaisseur et la dureté de l'épiderme (Brun *et al.*, 2007). De plus, la tavelure a montré sa capacité à contourner progressivement la résistance génétique (Van *et al.*, 2013). Les règles actuelles du marché ne favorisent pas pleinement les variétés tolérantes, malgré les gains potentiels liés à une économie de traitement (Van, 2011). En fin de compte, équilibrer les avantages de la tolérance avec les exigences du marché reste un défi crucial dans la recherche de solutions durables. La lutte variétale offre ainsi une solution, réduisant la dépendance aux fongicides tout en répondant aux exigences actuelles de durabilité.

1.1.2.3.2. Mesures prophylactiques

La gestion des feuilles mortes dans les vergers de pommiers constitue une pratique onéreuse, englobant des méthodes telles que l'exportation et la gestion externe des feuilles, impliquant des processus tels que l'utilisation d'aspirateurs, le compostage poussé, ou même la combustion (Laget *et al.*, 2015). Une alternative plus économique consiste à favoriser la décomposition des feuilles sur place dans la litière, en utilisant des techniques telles que l'andainage, le broyage, et/ou l'apport d'urée (Carisse and Dewdney, 2005).

Bien que ces méthodes parviennent à réduire l'inoculum du champignon, elles ne parviennent pas à une élimination totale de l'inoculum (Carisse and Jobin, 2006). Cependant, elles minimisent les risques d'émergence de résistance en réduisant la population du champignon (Brun *et al.*, 2007). De plus, elles offrent une meilleure gestion des dates de traitements, permettant de réduire la protection en début et en fin de période de projection des ascospores, les risques devenant suffisamment faibles. Ces méthodes, bien que précieuses, ne permettent pas une exemption totale de la protection contre l'inoculum primaire (Carisse and Jobin, 2006). La modélisation de la dynamique de la sporée primaire permet d'anticiper le pourcentage du stock de spores pouvant être projeté entre deux dates (Roubal, 2017). Elle est intégrée dans des outils d'aide à la décision tels que les logiciels RIMpro et Melchior (Acimović *et al.*, 2018; Brun *et al.*, 2007; Trapman and Polfliet, 1997) qui permettent de réduire le nombre de traitements en prenant en compte un risque raisonnable pour les parcelles où l'inoculum a été réduit (Benejam, 2021).

1.1.2.3.3. Lutte en agriculture biologique

Les substances chimiques actives autorisées en agriculture biologique sont le cuivre, le soufre et la bouillie sulfo-calcique (Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire *et al.*, 2023). Pour pouvoir utiliser ces substances actives, il faut répondre à des conditions d'application souvent contraignantes. Par ailleurs, l'utilisation de ces substances est de plus en plus pointée du doigt (cuivre) et la recherche de substitut est fortement encouragée. Dans le cadre de la gestion de la tavelure les substituts peuvent être, du phosphonates ou de l'hydrogénocarbonate de potassium (produits de biocontrôle).

Les produits de biocontrôle peuvent être des organismes vivants ou des produits issus de ces derniers. Cela peut être des macro-organismes, micro-organismes, des médiateurs chimiques ou des substances d'origine microbienne, végétale ou animale (Sévely *et al.*, 2023). Parmi ces solutions, on peut citer la laminarine qui peut être utilisée dans le cadre du biocontrôle, elle est produite par des algues brunes (Sévely *et al.*, 2023). Des micro-organismes comme *Bacillus subtilis* QST713 sont également utilisés comme produit de biocontrôle. Le mode d'action de cette souche est principalement basé sur la production de lipopeptides qui induisent la stimulation des défenses naturelles de la plante traitée. Ce sont des biomolécules prometteuses pour lutter contre la tavelure du pommier (Desmyttere *et al.*, 2019) et leur utilisation pourrait potentiellement réduire ou remplacer l'utilisation des fongicides cuivriques dans les vergers AB (et chimiques dans les vergers conventionnels). Les lipopeptides sont biodégradables et il a été démontré qu'ils présentent à la fois une activité antifongique (Desmyttere *et al.*, 2019; Moyne *et al.*, 2001) et des propriétés stimulant les mécanismes de défense des plantes contre les bioagresseurs (Cawoy *et al.*, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2015).

1.1.2.3.4. Lutte chimique

La tavelure est particulièrement problématique dans les régions au printemps humide et frais. Ce sont ces conditions climatiques que l'on trouve dans les Hauts-de-France et en Belgique. Le moyen pour lutter contre cette maladie est l'utilisation de fongicides avec l'aide d'outils d'aide à la décision telles que les tables de Mills et Laplace (Carisse and Jobin, 2006; Dreyfus and Roussel, 2008). Tous les outils développés permettent de déterminer quand et quels fongicides utiliser pour lutter efficacement contre *V. inaequalis* en limitant l'apparition de résistances. Malgré ces avancées, le nombre élevé de traitements fongicides pose des défis en termes de durabilité et de coûts (Holb, 2006). En effet, l'Indice de Fréquence de Traitement (IFT) est important en France, avec en moyenne 30 traitements.

Parmi les fongicides utilisés, on distingue les fongicides de contact tels que la bouillie bordelaise, le dithianon et le captane, qui ont un faible risque d'induction de résistance (Brent and Hollomon, 2007). Le dithianon et le captane est autorisé en France et limité pour les pommiers en Belgique. Leur mode d'action est souvent multisite et ce sont des inhibiteurs généraux d'enzymes qui affectent principalement la germination des spores. Cependant, leur inconvénient est qu'ils sont lessivables (Xu *et al.*, 2008). Par conséquent, ils sont généralement appliqués soit tôt dans la saison lorsque peu de feuilles sont présentes sur les arbres, soit lors de périodes sans pluie (Chatzidimopoulos *et al.*, 2020; Jobin and Carisse, 2007).

Les fongicides systémiques sont utilisés lorsque les conditions ne sont plus favorables aux fongicides de contact. Ils sont absorbés par la plante avec une mobilité variable et ont un mode d'action spécifique (Bartlett *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2011). Des composés ayant des effets sur la division mitotique (comme les benzimidazoles) ou provoquant des perturbations membranaires (comme la dodine)

ont été exclusivement utilisés depuis les années 1970 (Cabral, 1991; Jones and Walker, 1976). Dans les années 1980, les inhibiteurs de la déméthylation (IDM), perturbant la biosynthèse des stérols, ont été largement appliqués pour lutter contre diverses maladies fongiques des arbres fruitiers, y compris la tavelure du pommier. Au cours des trois dernières décennies, de nouveaux fongicides, présentant divers modes d'actions et efficaces contre *V. inaequalis*, ont été développés et mis en application. Ces fongicides se regroupent en différentes classes, dont les anilinoypyrimidines (inhibant la synthèse des protéines) (Mosbach *et al.*, 2017), les phénylpyroles (interférents dans les signaux de la transduction osmotique) (Brandhorst *et al.*, 2019), les inhibiteurs externes de la quinone (QoI) altérant la respiration mitochondriale (Bartlett *et al.*, 2002), et plus récemment, les inhibiteurs de la respiration de la classe des carboxamides, impliquant le complexe de la succinate déshydrogénase (SDH) dans la chaîne de transport mitochondrial (Stammler *et al.*, 2007).

2. Les traitements fongicides chimiques et résistances associées

L'utilisation des fongicides permet de réduire la présence de taches de tavelure sur les pommes. Cependant, l'utilisation excessive de fongicides conduit à l'émergence de résistances. Les fongicides à action systémique sont utilisés principalement après des épisodes de pluie, en cas de risque élevé d'infections primaires, et pour protéger la croissance précoce des plantes au printemps. Cependant, ces fongicides étant principalement des uni-sites, ils sont caractérisés par un risque accru de développement de résistances.

2.1. Méthyl, Benzimidazole, Carbamates

Les Méthyl Benzimidazole Carbamate (MBC) comprennent les benzimidazoles et les thiophanates (FRAC, 2023). Les benzimidazoles et les thiophanates sont respectivement composés d'un cycle benzène accolé à un cycle imidazole ou d'un cycle benzène associés à deux chaînes azolées. Leur utilisation a commencé dans les années 1970. Ce sont de bons produits curatifs mais ils sont aussi efficaces couplés avec des fongicides préventifs (Cox, 2015; Hoffmeister *et al.*, 2023). Cependant le manque de connaissances sur leur mode de fonctionnement et leur grande efficacité, a conduit à une utilisation intensive de ceux-ci. En très peu de temps, des cas de résistances sont apparus et persistent encore récemment (Chapman *et al.*, 2011; Chatzidimopoulos *et al.*, 2022; Jones and Walker, 1976; Katan *et al.*, 1983; Polat and Bayraktar, 2021). Ce groupe de molécules cible la β -tubuline contribuant à l'instauration de la forme des cellules (FRAC, 2023). La résistance est associée à des mutations ponctuelles du gène codant la β -tubuline (Cox, 2015; Polat and Bayraktar, 2021).

2.2. Inhibiteurs externes de la quinone

Les fongicides de la classe des inhibiteurs externes de la quinone (Quinone outside Inhibitors, QoI), englobent divers fongicides, dont les strobilurines, avec une structure chimique générale caractérisée par une quinone liée à une chaîne alkyle (Chatzidimopoulos *et al.*, 2022; Cox, 2015). Des fongicides, tel que le kresoxim-méthyl (Ypema and Gold, 1999) ont été enregistrés pour une utilisation contre la tavelure du pommier à partir de la fin du XX^{ème} siècle. Cependant, la résistance aux fongicides de la classe QoI chez divers phytopathogènes, y compris *V. inaequalis*, s'est développée dans les deux ans suivant leur introduction (Koenraadt *et al.*, 1992; Köller *et al.*, 2004). Récemment des cas de résistance ont été identifiés en Amérique du Nord, en Chine et en Turquie (Chapman *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2021; Polat and Bayraktar, 2021). Ces composés, inhibent la respiration fongique, en ciblant le complexe mitochondrial bc1 et en interférant avec le transport des électrons au site externe de la quinone (Chatzidimopoulos *et al.*, 2022; Hoffmeister *et al.*, 2023). Bien que leur efficacité initiale ait été notable, des cas de résistance aux fongicides QoI ont été signalés chez *V. inaequalis*, attribués généralement à des mutations génétiques au niveau du gène cytochrome b. Cette résistance peut émerger rapidement après l'introduction de ces fongicides, soulignant la nécessité d'une gestion attentive de leur utilisation (Cox, 2015).

2.3. Inhibiteur de la succinate déshydrogénase

Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) constituent un groupe de composés antifongiques pouvant être utilisés dans la lutte contre *V. inaequalis*. Les molécules de ce groupe contiennent en général un benzène et une liaison amide dans leur structure. Parmi ce groupe, on retrouve des fongicides tels que le boscalid, le fluopyram et le fluxapyroxad (FRAC, 2023). Leur utilisation vise à contrôler efficacement la prolifération de *V. inaequalis* en interférant avec la succinate déshydrogénase, une enzyme essentielle de la chaîne respiratoire mitochondriale des champignons (Chatzidimopoulos *et al.*, 2022; Cox, 2015). Ainsi, cela perturbe la production d'énergie nécessaire à la croissance fongique. Peu de cas de résistance aux SDHI sont reportés chez *V. inaequalis*. Des souches résistantes aux SDHI ont été découvertes en Italie et en Grèce (Chatzidimopoulos *et al.*, 2022; Toffolatti *et al.*, 2016). Hoffmeister *et al.*, (2023) montrent des cas de résistance aux SDHI mais ce sont des cas isolés qui n'augmentent pas en fréquence. Ces résistances ne sont pas stables sur différentes saisons contrairement aux cas de résistances avec les QoI et les DMI (Ayer *et al.*, 2020). Les SDHI ont été introduits plus tard pour la gestion de la tavelure. Pour limiter le développement de résistance, la gestion de tavelure avec des SDHI a été améliorée et contrôlée (Ayer *et al.*, 2020). Cette amélioration se réalise en limitant et contrôlant les doses et les mélanges des SDHI.

2.4. Triazoles

Les fongicides qui sont principalement utilisés dans la culture du pommier sont des fongicides se focalisant sur la biosynthèse des stérols présents au niveau des

membranes. Le groupe de fongicides qui nous intéresse sont les DMI (DeMethylation Inhibitors) comprenant les triazoles. Ce groupe vise principalement la C14 déméthylase à cytochrome P450 (CYP51) dans la biosynthèse des stérols (Yoshida and Aoyama, 1986) (Figure 1-3). Dans ce groupe, il y a différentes familles dont les triazoles contenant différentes substances actives (Shahinasi *et al.*, 2017). Les triazoles sont des composés organiques cycliques composés d'un cycle à cinq atomes, dont trois atomes d'azote (Faro, 2010) (Figure 1-3).

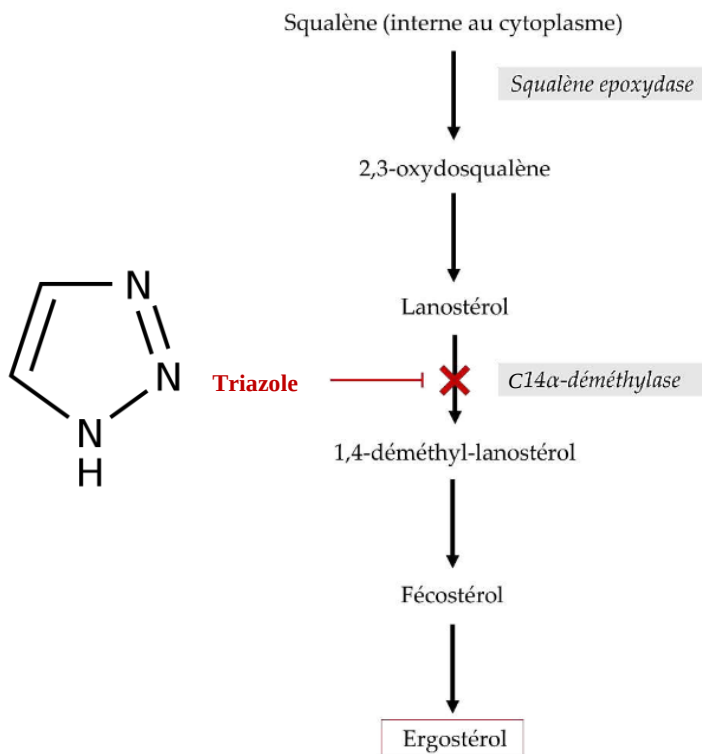


Figure 1-3 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol et action des triazoles (Godeau, 2023).

Les triazoles ont été introduits pour l'usage environnemental à partir de 1973. Les triazoles ont été autorisés sur tous les continents pour remplacer les fongicides organiques au mercure ou au cuivre utilisés depuis plus de 200 ans (Eastmond and Balakrishnan, 2010; Gupta, 2017). Ce groupe de molécule a été développé en premier par la société Bayer pour lutter contre les phytopathogènes (Schwinn, 1984). Leur large spectre d'action ciblant de nombreux phytopathogènes en font des fongicides estimés (Price *et al.*, 2015). Ils sont appliqués seuls ou en mélanges en tant que traitement préventif ou curatif. L'utilisation de ces molécules permet de limiter les pertes de rendement et l'impact de ceux-ci sur l'économie. Malgré leurs nombreux avantages, des inconvénients existent. Les triazoles polluent les sols, les eaux et

l'atmosphère (Godeau, 2022). Un autre inconvénient est l'apparition de résistances chez les phytopathogènes.

Depuis de nombreuses années, un certain nombre d'études a démontré des différences de sensibilités aux triazoles chez *V. inaequalis*. Cela a été mis en évidence pour les triazoles suivants: myclobutanil, difénoconazole, fenbuconazole, penconazole, fénarimol, tébuconazole (Cordero-Limon *et al.*, 2021; Desmyttere *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2009; Köller, 1991; Köller *et al.*, 1995; Kunz *et al.*, 1997; Muchembled *et al.*, 2018; Shirane *et al.*, 1996; Vijaya Palani and Lalithakumari, 1999; Villani *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2010). Comme les triazoles agissent au niveau de la CYP51, beaucoup de recherches se font sur cette enzyme et le gène correspondant. Les hypothèses pour expliquer les mécanismes de résistance sont les suivantes (Parker *et al.*, 2014) (Figure 1-4):

- La mutation du gène *Cyp51* (Price *et al.*, 2015; Yaegashi *et al.*, 2020),
- La surexpression du gène *Cyp51* (Schnabel and Jones, 2001; Villani *et al.*, 2016),
- La surexpression des gènes encodant les pompes à efflux (Hulvey *et al.*, 2012; Price *et al.*, 2015).

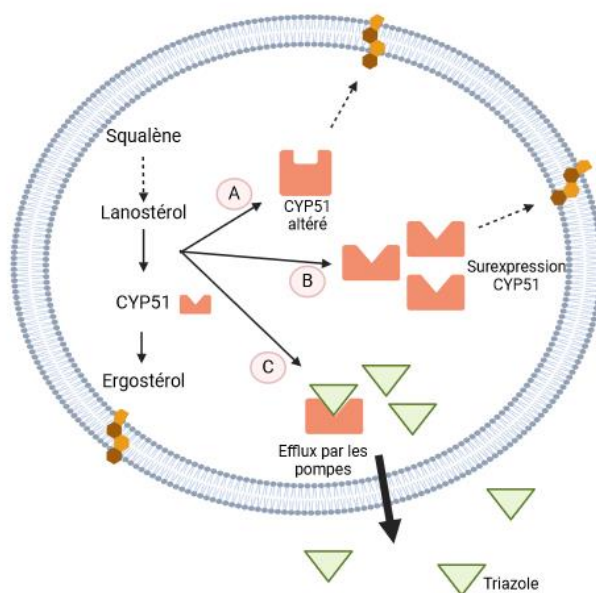


Figure 1-4 : Schéma synthétique des hypothèses pouvant expliquer la résistance aux triazoles. A: mutation du gène *Cyp51* ; B: surexpression du gène *Cyp51* ; C: Surexpression des gènes codant les pompes à efflux.

2.5. Hypothèses pouvant expliquer la résistance aux triazoles

2.5.1. Mutation *Cyp51*

Les stérols sont des composants essentiels pour réguler la fluidité des membranes cellulaires chez les eucaryotes (Ermakova and Zuev, 2017; Stephenson, 2010). La biosynthèse de ces stérols, nécessite de nombreuses enzymes dont la C14 déméthylase (Figure 1-3). Cette enzyme est la cible des azoles. Mais cette cible peut être modifiée par des mutations ce qui influence la sensibilité aux fongicides chez les champignons (Becher and Wirsal, 2012). Ces mutations sont régulièrement des délétions ou substitutions d'acides aminés dans la séquence (Villani *et al.*, 2016). La substitution la plus courante est celle de la tyrosine en phénylalanine à la position Y136F, mise en évidence chez *Uncinula necator*, *Blumeria graminis* et *Puccinia trititica*, cela réduit l'affinité entre l'antifongique et l'enzyme (Lye *et al.*, 1997; Wyand and Brown, 2005). Une autre mutation a été corrélée avec une sensibilité réduite chez *V. inaequalis* (Yaegashi *et al.*, 2020). Cette mutation est une substitution de la tyrosine en phénylalanine en position 133 (Y133F) (Yaegashi *et al.*, 2020).

2.5.2. Surexpression du gène *Cyp51*

La concentration intracellulaire de la C14 déméthylase de la cellule est corrélée à l'expression du gène *Cyp51*. La modulation de l'expression du gène *Cyp51* se fait au niveau de la région promotrice où les modifications de cette zone peuvent être l'insertion d'éléments répétés ou d'éléments transposables (Cools and Fraaije, 2013; Price *et al.*, 2015; Villani *et al.*, 2016). Cependant l'effet de ces modifications influençant l'expression de ce gène sur la résistance de la cellule est fréquemment inférieur aux mutations du gène lui-même (Cools *et al.*, 2013). La surexpression a été démontrée chez plusieurs champignons : *Monilinia fructicola* (Ma *et al.*, 2006), *Mycosphaella graminicola* (Luo and Schnabel, 2008), *Penicillium digitum* (Hamamoto *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2013) et *V. inaequalis* (Schnabel and Jones, 2001; Villani *et al.*, 2016). Pour *V. inaequalis*, la surexpression a été détectée par Schnabel and Jones (2001) en comparant l'expression du gène entre des souches sensibles et résistantes. Les chercheurs ont identifié une insertion d'un élément de 553pb en amont de la *Cyp51*. Pour Villani *et al.* (2016), la surexpression a aussi été détectée en comparant l'expression entre les deux types de souches. C'est un élément répété (EL 3,1,2), étant un amplificateur transcriptionnel, qui a été identifié en amont de la *Cyp51*. Ces recherches montrent l'importance de la surexpression du gène *Cyp51* comme mécanisme de résistance. Même si ce mécanisme ne concerne pas toutes les souches résistantes.

2.5.3. Surexpression des gènes codant pour les pompes à efflux

Les pompes à efflux sont essentielles chez les eucaryotes pour exporter des toxines de la cellule (Cannon *et al.*, 2009; Rizzo *et al.*, 2019). La surexpression des gènes encodant ces pompes peut mener à la résistance aux azoles ou réduire la sensibilité du

champignon. Le multidrug-resistant (MDR) est un phénotype de résistance à plusieurs produits d'inhibition non associés, provoqué par l'efflux important des fongicides (Cools and Fraaije, 2013). A ce jour, le mécanisme n'est pas complètement élucidé. Des études ont cherché à caractériser le mécanisme génétique de la surexpression des pompes à efflux. Chez *Zymoseptoria tritici*, ce mécanisme est sûrement impliqué dans la résistance de ce champignon (Omrane *et al.*, 2015). Chez *Botrytis cinerea* la surexpression des pompes à efflux de plusieurs fongicides a été démontrée (Kretschmer *et al.*, 2009).

Il existe différentes classes de pompes à efflux mais deux classes sont majoritaires : les ATP Binding Cassette (ABC) et les Major Facilitator Superfamily (MFS) (Cannon *et al.*, 2009; Cools and Fraaije, 2013; Villani *et al.*, 2016). Ces pompes sont localisées au niveau de la membrane plasmique (Rizzo *et al.*, 2019). Ces pompes permettent aux champignons de transférer des composés entre l'intérieur de la cellule et l'environnement extérieur en utilisant différentes sources d'énergie.

Il existe entre 10 à 30 gènes codant pour les pompes MFS et ABC chez les champignons (Cannon *et al.*, 2009; Coleman and Mylonakis, 2009; Leroux and Walker, 2010). Les pompes MFS utilisent la force protomotrice pour régir la translocation du substrat à travers la membrane plasmique (Cannon *et al.*, 2009; Omrane *et al.*, 2015). L'association des transporteurs ABC et la résistance aux azoles est plus souvent évoquée (Cannon *et al.*, 2009; Coleman and Mylonakis, 2009; Leroux and Walker, 2010). Les transporteurs ABC hydrolysent l'ATP et utilisent cette énergie pour exporter et importer un grand nombre de composés (Leroux and Walker, 2010; Rizzo *et al.*, 2019).

3. Structure d'une cellule fongique

3.1. Généralités

Les champignons ont un corps somatique (végétatif), appelé thalle. Les thalles peuvent être filamenteux ou plasmodial. Les thalles sont multicellulaires et peuvent être unicellulaire chez les levures. Le thalle filamenteux est formé par des hyphes ayant une forme tubulaire microscopique (Stephenson, 2010). Les filaments peuvent être ramifiés en différentes directions toujours par l'apex du champignon. L'ensemble des hyphes forme le mycélium. Les hyphes mycéliennes sont de longueurs indéterminées et ont souvent un diamètre assez constant (1-2 à 30 μm ou plus (5-10 μm)) (Deacon, 2006). La majorité des hyphes ont des cloisons transversales (septum). Cela divise l'hyphe en compartiments individuel ou cellules pouvant contenir un ou plusieurs noyaux. Le thalle peut être unicellulaire (Heitman *et al.*, 2017a).

Les cloisons sont formées par une extension localisée de la couche interne de la paroi de l'hyphe. Souvent les cloisons sont incomplètes et possèdent un ou plusieurs pore(s) (Heitman *et al.*, 2017a). Les cloisons délimitent les articles qui ressemblent à

la structure d'une cellule. Leurs rôles sont : le renforcement et la stabilisation des hyphes et la protection du mycélium. En cas de cassure d'un hyphe, la cloison se ferme et isole l'article cassé.

3.2. Composition et structure d'une cellule fongique

La cellule fongique est composée de plusieurs éléments pour son bon fonctionnement. Les composants majeurs d'une cellule fongique sont (Figure 1-5) :

- Les noyaux contenant l'ADN,
- Le réticulum endoplasmique permettant la synthèse des protéines ou de macromolécules mais aussi le transfert des molécules produites par des vésicules,
- L'appareil de Golgi permet de faire le tri des molécules et de les transférer. De plus, il régule le transport des vésicules et modifie les protéines par des modifications post-traductionnelles,
- Les mitochondries permettent de produire et de véhiculer de l'ATP où la demande d'énergie est forte.

L'ensemble de ces organites cellulaires permettent à la cellule de se développer et de réagir aux changements des conditions extracellulaires. Pour se défendre face au milieu extérieur, la paroi et la membrane plasmique sont les barrières de la cellule. Les parties suivantes décrivent plus en détails ces composants.

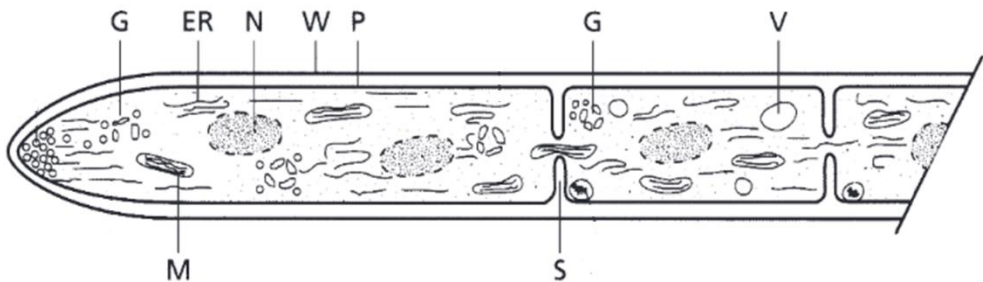


Figure 1-5 : Structure d'une cellule fongique (Deacon, 2006). ER = réticulum endoplasmique ; G = appareil de Golgi ; M = mitochondrie ; N = noyau ; P = membrane plasmique ; S = septum ; V = vacuole ; W = paroi.

3.3. La paroi cellulaire et la membrane plasmique

La paroi est la zone de contact entre le champignon et le milieu extérieur. Les nutriments sont absorbés via la paroi. Elle est composée de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Figure 1-6). Les polysaccharides majoritaires sont la chitine et les glucanes (Geoghegan *et al.*, 2017). Ils assurent la protection vis-à-vis d'agressions du milieu extérieur (Deacon, 2006; Heitman *et al.*, 2017b). La chitine joue un rôle sur la rigidité, les glycoprotéines sur l'adhérence et les

mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi. La membrane plasmique contient les enzymes participant à la synthèse de la chitine et des glucanes.

La paroi confère une rigidité et donne forme à l'hyphe. Cette rigidité peut varier en fonction des champignons et elle peut aider à entrer en force dans les organismes cibles (cas des phytopathogènes n'utilisant pas d'enzymes lytiques) (Heitman *et al.*, 2017b). Elle joue un rôle de protection contre la pression osmotique. Les protéines peuvent être des enzymes pour digérer des éléments nutritifs ou pour modifier les éléments structuraux de la paroi.

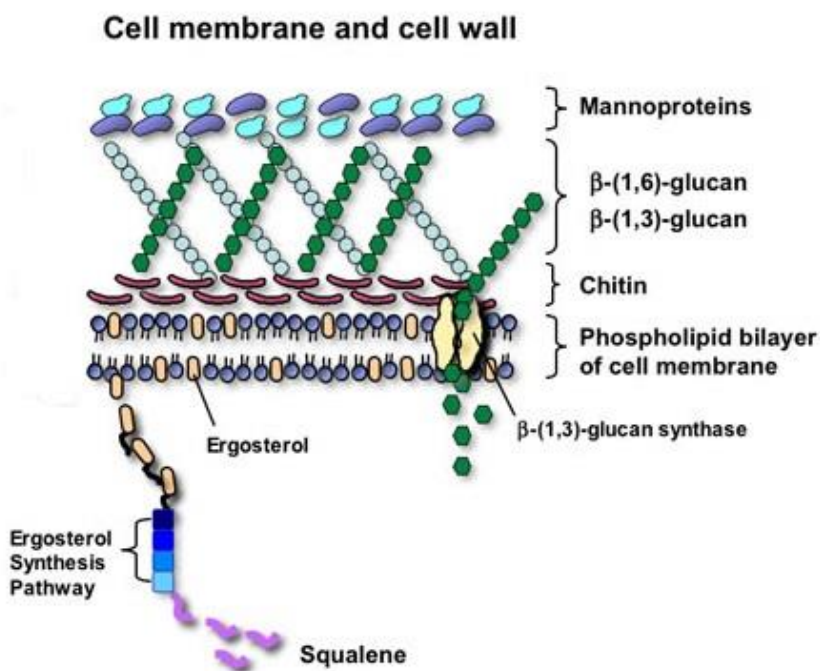


Figure 1-6 : Structure de la paroi et de la membrane plasmique fongique (Mycoses Study Group Education and Research Consortium, 2014).

La membrane plasmique est composée majoritairement de lipides mais aussi de protéines (Deacon, 2006). Il existe différents types de lipides comme les phospholipides, les acides gras, les stérols, ... Ces lipides ont différents rôles au sein d'une cellule et sont importants dans la constitution des champignons. Ils peuvent se trouver au niveau des différentes membranes (plasmique, nucléaire, Golgi, mitochondrie, ...) mais peuvent aussi être des lipides de réserves ou tout simplement servir à la signalisation cellulaire (Stephenson, 2010; Weete, 2012).

La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique contenant principalement des phospholipides (Figure 1-6) (Weete, 2012). Les principaux phospholipides sont la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine,

représentant environ 80% des phospholipides totaux. La phosphatidylsérine et la phosphatidylinositol constituent les 20% restants (de Kroon *et al.*, 2013; Perczyk *et al.*, 2020). Le deuxième élément important de la membrane plasmique est l'ergostérol (Figure 1-6) (Deacon, 2006; Stephenson, 2010). Il représente l'empreinte des champignons (Ermakova and Zuev, 2017). La proportion d'ergostérol peut varier d'une espèce à l'autre, de 2 à 50% molaires de toutes les molécules lipidiques formant la membrane plasmique (Ermakova and Zuev, 2017). De plus, selon les conditions environnementales, la membrane peut s'adapter et changer la teneur en ergostérol (Mannock *et al.*, 2010). En effet, les stérols permettent de réguler la fluidité et la perméabilité des membranes (Pan *et al.*, 2018). Il est également possible de trouver des microdomaines membranaires, appelés radeaux lipidiques (lipid raft) (Figure 1-7). Ces microdomaines sont riches en phospholipides, sphingolipides, stérols et protéines transmembranaires (Guimaraes *et al.*, 2014; Ripa *et al.*, 2021). Ces radeaux lipidiques vont influencer la transduction des signaux, l'activation des récepteurs, le trafic intracellulaire ou encore dans l'interaction hôte pathogène (Guimaraes *et al.*, 2014; Ripa *et al.*, 2021).

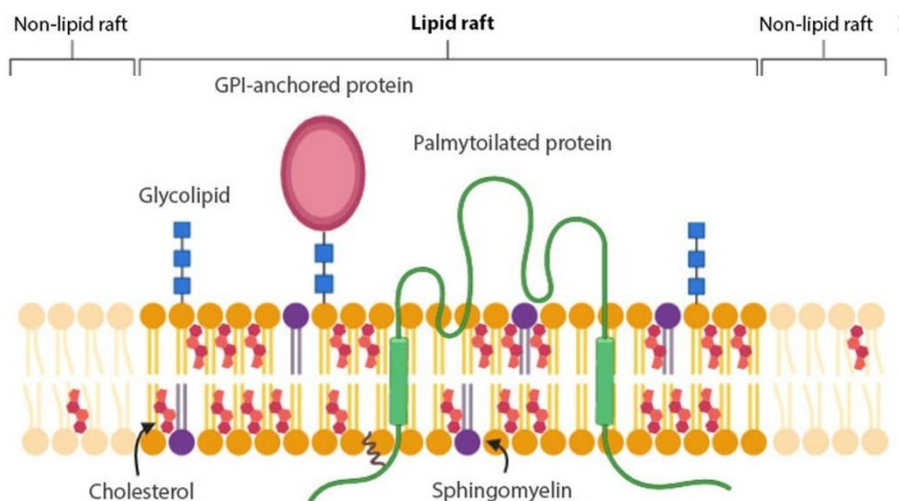


Figure 1-7 : Structure membranaire en présence d'un radeau lipidique (Ripa *et al.*, 2021)

Les lipides sont des composants majeurs de la membrane et ils sont une cible pour lutter contre *V. inaequalis*. Les lipopeptides produits par *Bacillus* spp. sont connus pour leurs interactions avec les lipides membranaires (Aranda *et al.*, 2005; Deleu *et al.*, 2008, 2005). Dans le contexte actuel de l'agroécologie et de l'agriculture durable, la recherche d'alternatives aux fongicides, comme l'utilisation de composés biochimiques, est largement encouragée (Falardeau *et al.*, 2013). Les lipopeptides produits par *Bacillus* spp, des bactéries bénéfiques du sol, sont des biomolécules prometteuses pour lutter contre la tavelure du pommier (Desmyttere *et al.*, 2019) et

leur utilisation pourrait potentiellement réduire ou remplacer l'utilisation de fongicides chimiques dans les vergers.

4. Les lipopeptides de *Bacillus*, source de nouvelles solutions antifongiques

4.1. Généralités sur *Bacillus*

Les bactéries du genre *Bacillus* appartiennent à la famille des Bacillaceae et à l'embranchement des Bacillota (anciennement appelés Firmicutes) (Chukwudulue *et al.*, 2023; Oren and Garrity, 2021). Ce sont des bactéries à Gram positif qui peuvent être aérobies ou anaérobies facultatives. Elles se distinguent par leur aptitude à produire des endospores en condition aérobie lorsque les conditions de croissance deviennent défavorables (Goto *et al.*, 2000). *Bacillus subtilis* est une des espèces de référence du genre. Elle est connue pour la production de molécules telles que des biosurfactants, des enzymes et des molécules biocides (Fritze, 2004). Différentes espèces du genre *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *licheniformis*, *amyloliquefaciens*, *velezensis*, ...) sont utilisées en agriculture comme agent de biocontrôle. Elles sont connues pour leur capacité à produire de nombreuses molécules antimicrobiennes telles que les lipopeptides ou les polykétides. Ces molécules sont des sources prometteuses de produits de biocontrôle (Caulier *et al.*, 2019; Ongena and Jacques, 2008).

Les lipopeptides forment une grande famille de molécules avec de nombreuses variations dans leurs structures. Synthétisés par des synthétases peptidiques non ribosomiques (Non-Ribosomal Peptides Synthetase ou NRPS), cela leur confère cette hétérogénéité de structures : nature et séquence des acides aminés, cyclisation, longueur et ramification de la chaîne d'acide gras (Jacques, 2011; Stein, 2005). Les lipopeptides peuvent être produits par de nombreux genres microbiens parmi lesquels *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Bacillus*. Ils sont composés d'un peptide cyclique (hydrophile) lié à une chaîne d'acides gras (hydrophobe), conférant une structure amphiphile et des propriétés tensioactives aux molécules (Figure 1-8) (Jacques, 2011; Stein, 2005).

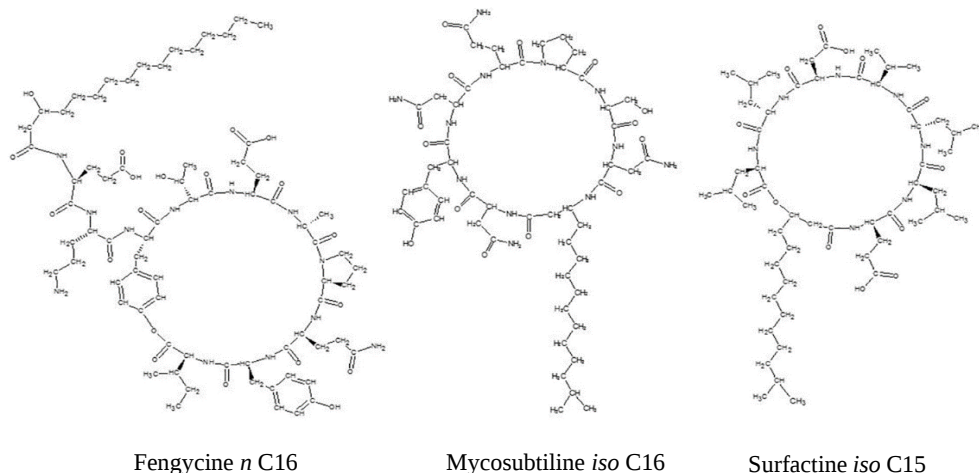


Figure 1-8 : Représentation de la structure chimique de de chaque famille de lipopeptides produits par *B. subtilis* : fengycine, mycosubtiline et surfactine (Desmyttere *et al.*, 2019).

4.2. Voie de biosynthèse des lipopeptides

Le mécanisme thiotemplate ou non ribosomique, découvert en 1971, révèle une voie de synthèse peptidique indépendante des ribosomes, et donc différente du dogme central de la biologie moléculaire (Lipmann *et al.*, 1971). Les métabolites ainsi produits ne passent pas par les ribosomes, mais sont assemblés par des synthétases de peptides non ribosomiques (Non Ribosomal Peptide Synthetase, NRPS) éventuellement combinées à des synthèses de polykétides (Polykétide Synthase, PKS) (Wilkinson and Micklefield, 2009). Ces synthétases, organisées en modules, sont codées par des opérons de grande taille (jusqu'à 5000 kDa) et impliquent plusieurs domaines catalytiques pour reconnaître, activer, modifier et condenser les monomères, y compris des versions modifiées d'acides aminés, permettant ainsi la formation de peptides divers (Marahiel, 2009; Samel *et al.*, 2008). Les PKSs, quant à elles, reconnaissent des monomères, tels l'acétyl-CoA, le malonyl-CoA, le propionyl-CoA et le 2S-méthylmalonyl-CoA (Lim *et al.*, 2016).

Les NRPSs comprennent trois types de modules : (i) un module d'initiation pour incorporer le premier acide aminé, (ii) un ou plusieurs modules d'élongation pour ajouter d'autres acides aminés et (iii) un module de terminaison pour terminer le peptide final (Marahiel, 2009; Vassaux, 2019). Chaque module comporte un enchainement de différents domaines catalytiques. Les domaines ont une fonction spécifique. Il existe quatre domaines principaux : adénylation, thiolation, condensation et thioestérase (Figure 1-9) (Schwarzer *et al.*, 2003). En plus de ces quatre domaines, différents domaines secondaires peuvent apporter des activités supplémentaires : épimérisation, méthylation, formylation, cyclisation... (Winn *et al.*, 2016).

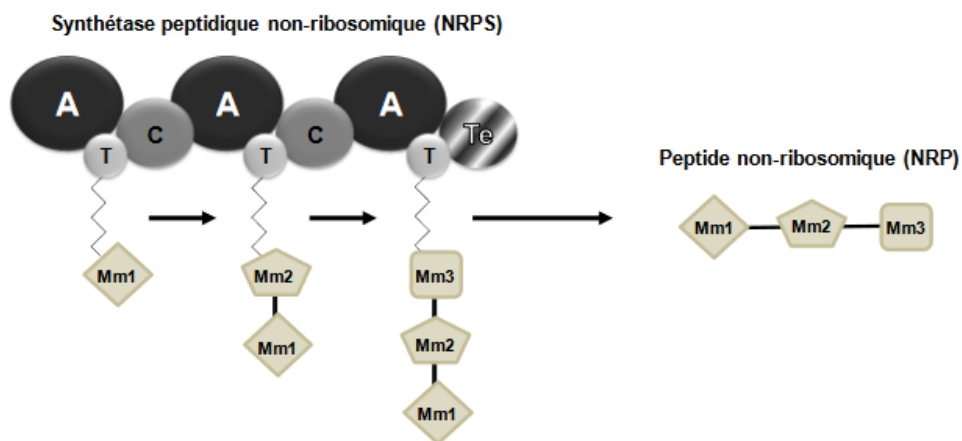


Figure 1-9 : Représentation schématique d'une NRPS, permettant l'assemblage de trois peptides (A = domaine d'adénylation ; T = domaine de thiolation ; C = domaine de condensation ; Te = domaine thioestérase ; Mm = monomère) (Vassaux, 2019).

Les activités des domaines principaux sont :

- Le domaine d'adénylation (A) occupe une position centrale au sein des synthétases, jouant un rôle crucial dans la reconnaissance et l'activation d'un acide aminé spécifique grâce à une réaction d'adénylation avec une molécule d'ATP (Challis and Naismith, 2004).
- Le domaine de thiolation (T ou PCP pour Peptidyl Carrier Protein) permet de fixer le peptide en cours de synthèse de manière covalente sur la synthétase tout au long du processus d'élongation. Cela est rendu possible par une réaction de thiolation entre un acide aminé activé et le groupement phosphopantéthéinyl fixé au domaine PCP.
- Le domaine de condensation (C) facilite la formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés en catalysant une réaction d'addition électrophile. Cette réaction se déroule entre le groupement carboxyle de l'acide aminé fixé dans le premier module et le groupement amine de l'acide aminé fixé dans le deuxième module (Schwarzer *et al.*, 2003).
- Le domaine de thioestérase (Te), situé dans le dernier module, est responsable du clivage de la liaison thioester qui lie le peptide synthétisé au dernier domaine PCP. Ce processus entraîne la libération du peptide nouvellement formé (Tseng *et al.*, 2002). Le clivage peut conduire à un peptide linéaire, mais fréquemment, il résulte en un processus de cyclisation (Samel *et al.*, 2006).

L'activité des domaines secondaires est généralement liée à la modification des monomères du peptide. Le domaine d'épimérisation transforme les acides aminés L activés en leurs énantiomères D (Samel *et al.*, 2014). Les domaines de méthylation et de formylation ajoutent respectivement un groupement méthyl et un groupement formyl à l'acyl thioester. Le domaine de cyclisation, structuellement très similaire au domaine de condensation, favorise la cyclisation de certains monomères ou groupes de monomères (Challis and Naismith, 2004).

L'incorporation de la chaîne d'acides gras à la partie peptidique est initiée par un domaine de condensation spécifique, le domaine de condensation starter (Hu *et al.*, 2019). La synthèse partielle de la chaîne d'acides gras peut être réalisée par un autre groupe d'enzymes modulaires appelées les synthases de polykétide (PKS). Dans ce cas, la synthèse des biomolécules nécessite un hybride PKS/NRPS.

Parmi les peptides non ribosomiques ou NRPs, il existe différents types d'activités, antioxydantes, antimicrobiennes, sidérophores, ... Les lipopeptides peuvent avoir plusieurs activités. De plus, ils se distinguent parmi les NRPs du fait de la présence d'une chaîne lipidique à leur extrémité N-terminale (Hu *et al.*, 2019). Il existe trois grandes familles de lipopeptides chez *Bacillus* : les fengycines, les surfactines et les iturines (Figure 1-8). Ces molécules ont leurs particularités structurales qui induisent des activités biologiques différentes (Ongena and Jacques, 2008).

Les lipopeptides sont des molécules prometteuses du fait de leurs nombreuses activités dont des activités antifongiques. Les surfactines, les fengycines et les iturines comprennent 7 ou 10 acides aminés formant un cycle (Ongena and Jacques, 2008). La chaîne d'acide gras, peut avoir une longueur variable de 12 à 18 carbones avec des isoméries variables (linéaire, *iso* et *anteiso*). Une même souche peut produire plusieurs familles et plusieurs isomères de chaque famille (Jacques, 2011).

4.2.1. Fengycines

Les fengycines sont des lipodécapeptides connus pour leur forte activité antifongique, en particulier contre les champignons filamenteux. Elles sont constituées d'une chaîne peptidique partiellement cyclique, composée de dix acides aminés, à savoir L-Glu, D-Orn, D-Tyr, D- α Thr, L-Glu, D-Ala/D-Val, L-Pro, L-Gln, L-Tyr, et L-Ile, liée à une chaîne lipidique β -hydroxylée de 13 à 19 atomes de carbone saturée ou insaturée (Caulier *et al.*, 2019; Hamley *et al.*, 2013). Seuls huit des dix acides aminés forment le cycle peptidique. Des isoformes des fengycines existent dus à la variabilité possible de la chaîne d'acide gras mais aussi selon la composition des acides aminés. Il existe les fengycines A et B correspondant à un changement d'acide aminé en position 6, respectivement D-alanine et une D-valine (Jacques, 2011). Il existe aussi les plipastatines A ou B, elles possèdent la même structure que les fengycines, à l'exception d'une L-Tyr en position 3 et d'une D-Tyr en position 9.

Les fengycines, de par leur activité antifongique, sont des inhibiteurs des phytopathogènes. Plusieurs études montrent que la fengycine interagit avec la membrane par formation de vésicule pouvant aller jusqu'à l'explosion (Botcazon *et al.*, 2022; Desmyttere *et al.*, 2019; Vanittanakom *et al.*, 1986; Zhang and Sun, 2018). Pour cela, la fengycine a besoin de former au minimum des dimères ou des agrégats pour interagir avec la membrane (Deleu *et al.*, 2008; Sur *et al.*, 2018; Zakharova *et al.*, 2019). Les fengycines vont s'agréger entre elles via les interactions entre la tyrosine 4 et 10 et l'isoleucine 11 (Sur *et al.*, 2018). De plus, la phosphatidylglycérol va repousser la fengycine, ce qui peut aider à l'interaction des fengycines entre elles (Sur *et al.*, 2018). Une fois la formation d'agrégats réussie, la fengycine va interagir avec la membrane par ancrage en profondeur (Deleu *et al.*, 2008) ou par formation de pores (Patel *et al.*, 2011; Zakharova *et al.*, 2019). Ces phénomènes perturbent la membrane et vont entraîner une fuite membranaire pouvant conduire à la mort cellulaire. La mort cellulaire va dépendre de plusieurs choses. D'abord si la fuite est graduelle ou tout ou rien (Patel *et al.*, 2011). Si la fuite est graduelle, la cellule peut compenser et réparer la membrane pour éviter la mort cellulaire. Si la fuite est tout ou rien, la cellule ne peut pas compenser la perte, ni réparer la membrane et cela provoque la mort cellulaire. En plus de la fuite cellulaire, les fengycines peuvent induire d'autres mécanismes entraînant la mort cellulaire. Les fengycines induisent la production de dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) (Botcazon *et al.*, 2022; Zhang and Sun, 2018). Les ROS peuvent oxyder les protéines, l'ADN et les lipides, cela entraînant la mort cellulaire. Il a aussi été démontré que la fengycine peut atteindre l'ADN, se lier avec le sillon majeur ce qui altère la structure de l'ADN et sa morphologie pouvant causer la condensation de l'ADN (Liu *et al.*, 2019; Zhang and Sun, 2018). L'ensemble de ces mécanismes est le signe de la mort cellulaire programmée (Botcazon *et al.*, 2022). La fengycine fonctionne donc par perturbation de la membrane pour entraîner la mort cellulaire. Ce qui n'est pas clairement établi, c'est le mode d'action de la fengycine avec la membrane pour mener à cette perturbation, et en particulier les interactions avec les lipides.

Les fengycines sont aussi connues pour induire la Réponse de Système Immunitaire (ISR) chez les plantes (Ongena *et al.*, 2007). La fengycine agit comme éliciteur, stimulant l'accumulation de composés phénoliques chez les plantes (Ongena *et al.*, 2005). Parmi ces mécanismes, le métabolisme des phénylpropanoïdes va être influencé par les différents composés phénoliques, favorisant la synthèse de la lignine. La production de lignine va rigidifier les parois cellulaires de la plante, renforçant ainsi la résistance des cellules végétales (Hoffmann, 2003). Ceci n'est qu'un exemple des conséquences de la résistance induite. Mais les fengycines ne sont pas les lipopeptides induisant le plus l'ISR chez les plantes. Ce sont surtout les surfactines.

4.2.2. Surfactines

Les surfactines sont connues pour leurs propriétés surfactantes (Jacques, 2011). Les surfactines sont des heptapeptides avec une chaîne d'acide gras β -hydroxylée de 12 à

17 carbones (Jacques, 2011; Théâtre *et al.*, 2022). Dans le cas de la surfactine, la partie peptidique a la structure suivante : L- Glu – L-Leu – D-Leu – L-Val – L-Asp – D-Leu – L-Leu. Il existe environ 20 isomères de surfactines avec des variations en acides aminés à des positions spécifiques (Position 1, 2, 4 et/ou 7) (Théâtre *et al.*, 2021). La longueur de la chaîne lipidique peut varier également. Ces paramètres structuraux vont influencer l'activité de la molécule (Théâtre *et al.*, 2021).

La surfactine se distingue par ses multiples propriétés, dont son caractère antiviral, résultant de son interaction avec les membranes de divers virus encapsulés (Rodrigues *et al.*, 2006). Grâce à ces activités, la surfactine offre des perspectives prometteuses en recherche ou applications médicales. En outre, elle peut inhiber la coagulation, induire la formation de canaux ioniques dans les membranes lipidiques, avoir un effet anti-inflammatoire ou anti-tumorale (Jacques, 2011; Ongena and Jacques, 2008). En tant que biosurfactant efficace, la surfactine trouve une large gamme d'applications, notamment dans les produits dermatologiques et les cosmétiques nettoyants (Rosenberg and Ron, 2013).

Les surfactines ont de fortes propriétés surfactantes, permettant d'interagir avec les membranes lipidiques (Jacques, 2011; Ongena and Jacques, 2008). Cependant elles n'ont pas ou peu de fongitoxicité (Desmyttere *et al.*, 2019; Pérez-García *et al.*, 2011). Mais en présence d'autres lipopeptides, telles que l'iturine A ou la fengycine, la surfactine a un effet synergique sur l'activité antifongique (Desmyttere *et al.*, 2019; Leclère *et al.*, 2006). L'effet synergique peut être expliqué par la formation de micelles mixtes agissant plus efficacement que des micelles simples (Maget-Dana *et al.*, 1992).

Même si les surfactines n'ont pas d'effet antifongique, elles restent des molécules très intéressantes pour la stimulation des défenses des plantes (Ongena and Jacques, 2008). Cet effet stimulant sur les défenses des plantes est souvent associé à plusieurs mécanismes (Ongena *et al.*, 2007), telle que l'induction de la production de phytoalexines, des composés chimiques toxiques pour les pathogènes. Mais aussi l'augmentation de l'activité des espèces réactives de l'oxygène (ROS), aidant ainsi à neutraliser les agents pathogènes (Fobert and Després, 2005). De plus, les surfactines peuvent renforcer la barrière cuticulaire des feuilles, ce qui rend les plantes plus résistantes aux attaques externes.

4.2.3. Iturines

Les iturines se distinguent par leur puissante activité antifongique. Composées de sept acides aminés formant un anneau peptidique lactame avec une chaîne d'acide gras β -aminé de 14 à 18 carbones saturée (Stein, 2005). Cette famille comprend sept grands groupes de molécules : les bacillomycines Lc, L, D et F ; les iturines A et C et la mycosubtiline (Maget-Dana *et al.*, 1985; Peypoux *et al.*, 1984). La substitution de cinq acides aminés et la variation de la taille de la chaîne lipidique engendrent

plusieurs isoformes et homologues (Besson *et al.*, 1978). Seules la D-tyrosine en position 2 et la D-asparagine en position 3 sont invariables. De plus, la chiralité des acides aminés est toujours la suivante : LDDLLDL.

Les iturines, comme les fengycines, jouent un rôle clé dans l'effet antagoniste vis-à-vis des phytopathogènes, bien que leur efficacité puisse avoir un spectre d'activités plus large (Romero *et al.*, 2007). Dans le cadre du biocontrôle, les iturines exercent une activité antifongique significative en interagissant avec les composants lipidiques de la membrane fongique, tels que les stérols et les phospholipides. Elles peuvent altérer les membranes par perméabilisation membranaire, en formant des pores ioniques (Aranda *et al.*, 2023, 2005; Zakharova *et al.*, 2019). Cette action a été démontrée contre divers pathogènes fongiques, notamment *Z. tritici*, *B. lactucae* et *Fusarium oxysporum* (Deravel *et al.*, 2014b; Mejri *et al.*, 2018; Mihalache *et al.*, 2018).

Au sein de la famille des iturines, les niveaux d'activités ne sont pas les mêmes. Cela a été démontré par Besson *et al.* (1979) contre *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, l'iturine A et la bacillomycine L ont une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 30 µg/mL alors que celle de la mycosubtiline est de 10 µg/mL. La CMI de *B. cinerea* de quatre isoformes de bacillomycine D varie de 4 à 28 µM et celle de quatre isoformes de mycosubtiline de 8 à 32 µM (Béchet *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2014). Cela montre qu'il existe une variation de l'activité antifongique entre les lipopeptides d'une même famille mais aussi entre les isoformes d'un même lipopeptide.

5. Objectifs de ces travaux de thèse

L'état de l'art présenté ci-dessus a permis de mettre en évidence l'importance de trouver des alternatives écologiques pour lutter contre la tavelure du pommier causée par *V. inaequalis*. La tavelure du pommier est la maladie la plus importante affectant les vergers de pommiers dans le monde entier, tant en termes de contrôle que de pertes commerciales. Les fruits affectés par la maladie ne seront pas commercialisables et les arbres affectés seront affaiblis. Malgré l'utilisation de méthodes prophylactiques, l'application de fongicides reste prédominante. La tavelure du pommier peut être contrôlée par l'utilisation de fongicides. L'une des familles de fongicides les plus utilisées contre la tavelure du pommier est celle des azoles. Cette famille appartient au groupe des DMI qui ciblent la biosynthèse des stérols fongiques. Les azoles ciblent l'enzyme C14-déméthylase (CYP51) codée par le gène *Cyp51A*, qui est essentielle pour la biosynthèse des stérols tels que l'ergostérol. L'ergostérol est un composant nécessaire à la régulation de la stabilité de la membrane cellulaire chez les eucaryotes et est considéré comme une empreinte digitale des champignons. Cependant, de plus en plus de cas de résistance ou de sensibilité réduite aux fongicides ont été signalés dans le monde. Pour cela, comprendre les mécanismes d'action des fongicides chimiques, ici les triazoles, utilisés contre la tavelure du pommier, est nécessaire. L'utilisation massive de fongicides chimiques a de graves conséquences sur

l'environnement (pollution, résidus, résistance). Il est donc aussi essentiel de développer des méthodes de lutte alternatives, tels que les biopesticides. Plusieurs travaux ont étudié l'utilisation de produits de biocontrôle pour surmonter ces inconvénients. Parmi ces produits de biocontrôle prometteurs, les lipopeptides de *Bacillus* représentent une très bonne alternative aux pesticides chimiques. Mais leurs mécanismes d'action sont mal compris.

Mes recherches de doctorat ont porté sur l'analyse de deux souches de *V. inaequalis* ayant deux sensibilités différentes aux triazoles : une souche sensible (S755) et une souche de sensibilité réduite (Rs552). Ces souches ont été obtenus auprès de l'INRAE d'Angers. La souche S755 a été isolée en 1991 à partir d'un pommier de variété Golden situé à Beaucouzé (Angers). La souche Rs552 a été isolée en 1990 à partir d'un pommier de variété Golden situé dans un verger de la Corrèze. Lors d'une précédente étude réalisée dans le cadre d'un projet collaboratif intitulé AgriBioPOM, les résultats ont montré que ces souches présentaient une différence de sensibilité pour certains lipopeptides. C'est dans ce cadre que mon doctorat a cherché à répondre à différentes questions scientifiques (Figure 1-10).

- **1 :** Des mélanges lipopeptidiques sont-ils efficaces *in vitro* et en verger ?
- **2 :** Quelle est l'explication génétique de la sensibilité réduite au tébuconazole de la souche Rs552 et a-t-elle un lien avec la résistance aux lipopeptides ?
- **3 :** Les lipopeptides d'une même famille ont-ils la même activité antifongique contre S755 et Rs552 ?
- **4 :** Enfin, existe-t-il une différence de composition lipidique qui pourrait expliquer la résistance de Rs552 à la fengycine ?

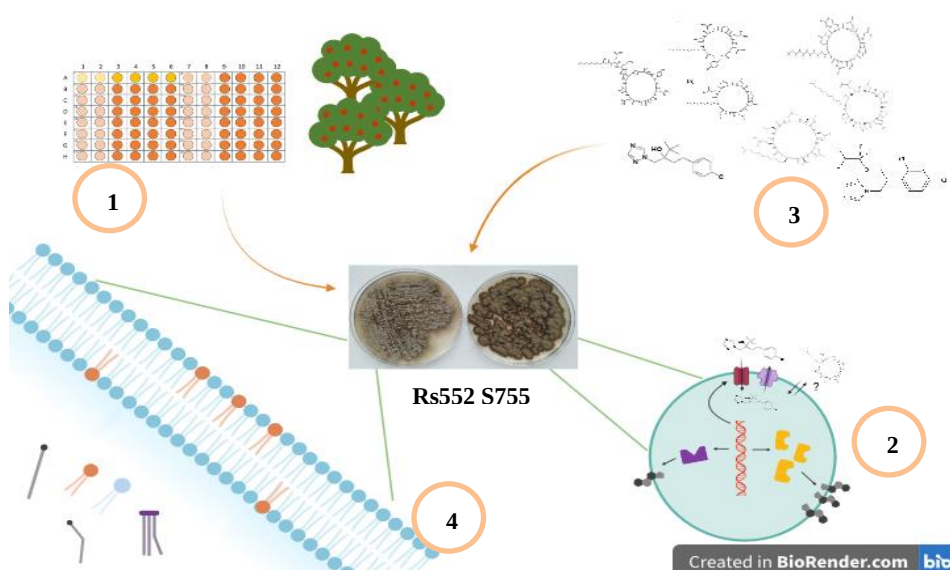


Figure 1-10 : Schéma des objectifs. 1, analyse des activités antifongiques de mélanges lipopeptidiques *in vitro* et en verger ; 2, caractérisation génétique et biochimique de la sensibilité réduite de Rs552 ; 3, activités antifongiques *in vitro* des lipopeptides par famille ; 4, analyse lipidomique des souches S755 et Rs552.

L'ensemble de ces questions a dirigé mes recherches pour mener aux résultats qui seront présentés en deux parties. Afin d'expliquer le lien ou non entre la sensibilité réduite d'une souche de Rs552 et sa résistance aux lipopeptides. Mais aussi de comprendre le mécanisme d'action des lipopeptides comme produits de biocontrôle contre *V. inaequalis*.

Dans une première partie de ce manuscrit, seront présentés les résultats obtenus par des mélanges de lipopeptides purifiés pour lutter contre *V. inaequalis* à l'échelle du laboratoire mais également en verger. Ces travaux auxquels j'ai, en partie, participé ont fait l'objet d'une publication qui sera reprise dans ce manuscrit.

La deuxième partie de ce manuscrit portera sur la caractérisation génétique et biochimique de la résistance/sensibilité au tébuconazole de deux souches de *V. inaequalis* Rs552 (résistante) et S755 (sensible). Trois hypothèses pouvant expliquer les mécanismes de résistance de Rs552 seront investiguées : (i) la mutation du gène *Cyp51* ; (ii) la surexpression du gène *Cyp51* ; (iii) la présence d'un phénomène d'efflux. Ce chapitre permettra également d'évaluer et de comprendre l'importance de la composition lipidique du champignon dans le mécanisme d'action des lipopeptides et plus particulièrement de la fengycine. Pour cela, des analyses du lipidome des souches de *V. inaequalis* ainsi que des observations microscopiques ont été effectuées.

Chapitre 2

**Évaluation de mélanges de lipopeptides
produits par *Bacillus subtilis* comme
produits de biocontrôle contre la tavelure
du pommier (*Venturia inaequalis*) en
agriculture biologique**

1. Introduction

Comme cela a été décrit au chapitre 1, les lipopeptides produits par *Bacillus* spp., sont des molécules prometteuses pour lutter contre les champignons phytopathogènes et notamment contre la tavelure du pommier (Desmyttere *et al.*, 2019). Ils sont biodégradables et ont démontré des propriétés fongicides et de stimulation des défenses des plantes (Cawoy *et al.*, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015; Desmyttere *et al.*, 2019; Moyne *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2015). Leur utilisation pourrait potentiellement réduire ou remplacer les fongicides actuels à base de produits pétrochimiques.

Bien que les lipopeptides soient des molécules prometteuses, différents verrous existent à leur utilisation aux champs. Premièrement, le niveau de production des souches naturelles reste faible pour une exploitation industrielle. Deuxièmement, les souches naturelles produisent le plus souvent des mélanges de familles de lipopeptides (surfactines/iturines ; surfactines/fengycines ; surfactines/iturines/fengycines). Dès lors, pour obtenir de hautes productivités d'une seule famille de lipopeptides, les souches doivent être modifiées génétiquement (Béchet *et al.*, 2013; Coutte *et al.*, 2010). Or cela ne répond pas à l'objectif de l'utilisation des lipopeptides en agriculture biologique. Il n'est pas non plus possible de faire des mélanges de lipopeptides à partir de plusieurs productions de lipopeptides par des souches OGM. Cependant, les souches naturelles produisant des mélanges de lipopeptides peuvent être utilisées. Il est possible d'orienter la production des lipopeptides et leurs ratios en modifiant les paramètres de croissance (pH, la température, le transfert d'oxygène et la composition du milieu de culture). La production de la surfactine par rapport à la fengycine peut être favorisée et inversement. Cela a été montré en modifiant le transfert d'oxygène (Coutte *et al.*, 2010; Fahim *et al.*, 2012). La production de lipopeptides est aussi impactée par les sources de carbone et d'azote, comme démontré par Yaseen *et al.* (2017) avec l'utilisation du mannitol et d'un mélange d'urée et de sulfate d'ammonium. Cela a permis d'avoir un effet significatif sur la production de la fengycine. Les travaux qui vont être présentés dans la suite de ce chapitre ont pour but de tester des mélanges naturels de lipopeptides dans des vergers biologiques pour lutter contre *V. inaequalis*.

A l'origine des travaux présentés dans ce premier chapitre il y a le projet Régional AgriBioPOM. Ce projet porté par le Dr François COUTTE et réunissant quatre partenaires (JUNIA, Université de Lille, Université de Liège/Gembloux AgroBio-Tech et la FREDON Hauts de France) a eu pour objectif d'investiguer l'utilisation de mélanges de lipopeptides pour lutter contre la tavelure du pommier en agriculture biologique. Ce projet de recherche collaboratif avait pour objectifs :

- De déterminer l'impact de la composition des mélanges de lipopeptides fengycine/surfactine ou mycosubtiline/surfactine sur leur efficacité contre une souche de *V. inaequalis in vitro* ;
- D'optimiser la production des meilleurs mélanges par génie métabolique ;

- De tester l'efficacité de ces mélanges en verger ;
- D'évaluer la rémanence des lipopeptides sur les fruits après récolte.

Mon travail de thèse à JUNIA, dans le cadre de ces travaux, s'est principalement concentré sur la conception et la réalisation des expériences *in vitro* relatives au premier objectif, ainsi que l'analyse et la discussion des résultats obtenus pour cette partie du travail. L'Université de Lille a optimisé la production des mélanges de lipopeptides et étudié leur rémanence sur les fruits. L'université de Lille et Gembloux AgroBioTech ont monté en échelle la production et la purification des mélanges. La FREDON Hauts de France a mené les expériences en verger d'agriculture biologique. La plupart des résultats générés dans ce projet ont fait l'objet d'un article présenté ci-dessous que j'ai co-rédigé.

2. Résumé des principaux résultats obtenus

Le principal objectif était d'utiliser des mélanges de lipopeptides d'origine biologique produits par des souches naturelles non génétiquement modifiées. Pour répondre à cet objectif, des activités antifongiques *in vitro* ont été réalisées afin d'identifier le meilleur mélange de lipopeptides produits par des souches naturelles de *B. subtilis* pour lutter contre la tavelure du pommier lors de leur application dans des vergers biologiques. Les résultats des expériences *in vitro* que j'ai menées à JUNIA ont montré que la fengycine (F), la mycosubtiline (M) et la surfactine (S) présentent une activité antifongique différente contre *V. inaequalis*. Avec F ayant une activité supérieure à M qui elle-même a une activité supérieure à S. Les mélanges FS 50-50% et MS 80-20% présentent une activité antifongique intéressante mais tout aussi efficace que 100 % de fengycine ou 100 % de mycosubtiline.

Les résultats de notre étude sur les lipopeptides purifiés montrent, sans aucun doute, l'implication de ces molécules dans la protection contre la tavelure du pommier. Il est important de pouvoir contrôler et orienter le métabolisme de la souche. Dans notre cas, pour produire le meilleur mélange de lipopeptides et ainsi augmenter l'efficacité de la préparation du produit, l'optimisation du milieu de culture de *B. subtilis* est importante. Pour le mélange FS, la meilleure composition a été l'utilisation de glycérol (source de carbone) et d'acide glutamique (source d'azote) par rapport au mannitol et au glucose dans le premier cas et à l'arginine et à l'urée + ammonium dans le second cas. De plus, l'utilisation d'un mélange combinant une molécule très antifongique comme la mycosubtiline ou la fengycine avec la surfactine dans les traitements des vergers peut présenter plusieurs avantages majeurs. Le premier est de bénéficier de l'effet synergique contre le phytopathogène. Le second serait que la surfactine pourrait induire la défense immunitaire du pommier vis-à-vis de pathogènes comme cela a été démontré sur d'autres plantes (Cawoy *et al.*, 2014). A l'heure actuelle, cet effet n'a pas encore été signalé pour le pathosystème pommier/*V. inaequalis*, mais il s'agit d'une voie intéressante à explorer dans le futur.

Les essais en vergers ont été réalisés avec des ratios de fengycine/surfactine 55% et 45% et de mycosubtiline/surfactine 80%/20%. Le ratio de fengycine/surfactine est de 45%/55% et non 50%/50%. Cette différence est due aux différentes étapes de purification qui ont engendré quelques pertes de molécules, déséquilibrant le ratio final. Au cours de deux campagnes différentes, il a été observé une efficacité significative des mélanges lipopeptidiques pour la protection contre la tavelure du pommier. En particulier, le mélange composé de mycosubtiline (80%) et de surfactine (20%) qui a montré une efficacité significative, proche de la référence (Cuivre/souffre), tout au long du cycle de la maladie. Ce mélange a permis une réduction de l'incidence de la maladie de 60%. En revanche, le mélange de fengycine (55%) et de surfactine (45%) semble n'apporter une protection qu'en cas de faibles pressions de la maladie. Les lipopeptides seuls n'ont pas été testés en verger car il n'est pas possible d'obtenir ces lipopeptides en si grande quantité sans utiliser une souche non génétiquement modifiée.

Enfin, la persistance des lipopeptides sur la peau et la chaire des pommes a été évaluée 45 jours après le dernier traitement et après 15 jours de stockage au froid. Cela permet de savoir si les lipopeptides peuvent être utilisés pour remplacer les fongicides chimiques. Seule la mycosubtiline n'est pas présente sur la peau et dans la chaire du fruit. La présence de fengycine est inférieure au seuil acceptable de 0,01 mg de lipopeptide/kg de pomme sur la peau et dans la chaire. Alors que la surfactine est présente à des quantités supérieures à 0,03 mg de lipopeptide/kg de pomme, qui est la limite recommandée. L'ensemble des résultats de ces études permet de dire que les lipopeptides sont de potentiels produits de biocontrôle prometteurs pour remplacer totalement ou partiellement les fongicides chimiques.

Une partie de ces résultats ont fait l'objet d'une communication orale lors de la Conférence Internationale des Maladies des plantes à Orléans du 6 au 8 décembre 2022 : Aline Leconte, Justine Jacquin, Caroline Deweer, Jérôme Muchembled, Magali Deleu, François Coutte et Philippe Jacques. « Etude *in vitro* et *in planta* de l'activité antifongique de différents lipopeptides de *Bacillus* spp. contre *Venturia inaequalis* ».

Les résultats présentés ont fait l'objet d'un article publié en 2022 dans le journal MDPI Microorganisms. Cet article est repris dans son intégralité ci-après.



Article

Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*)

Aline Leconte ^{1,2,3}, Ludovic Tournant ⁴, Jérôme Muchembled ², Jonathan Paucellier ¹, Arnaud Héquet ⁵, Barbara Deracinois ¹, Caroline Deweer ², François Krier ¹, Magali Deleu ³, Sandrine Oste ⁴, Philippe Jacques ^{3,5} and François Coutte ^{1,5,*}

¹ UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Equipe Métabolites Secondaires D'origine Microbienne, Institut Charles Viollette, Université de Lille, F-59000 Lille, France

² JUNIA, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Equipe Métabolites Spécialisés D'origine Végétale, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

³ UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Equipe Métabolites Secondaires D'origine Microbienne, TERRA Teaching and Research Centre, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, B-5030 Gembloux, Belgium

⁴ FREDON Hauts-de-France-265 rue Becquerel, F-62750 Loos-en-Gohelle, France

⁵ Lipofabrik SAS, 917 rue des Saules, F-59343 Lesquin, France

* Correspondence: francois.coutte@univ-lille.fr



Citation: Leconte, A.; Tournant, L.; Muchembled, J.; Paucellier, J.; Héquet, A.; Deracinois, B.; Deweer, C.; Krier, F.; Deleu, M.; Oste, S.; et al. Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms* **2022**, *10*, 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>

Academic Editor: Essaid Ait Barka

Received: 15 July 2022

Accepted: 5 September 2022

Published: 9 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/>)

Abstract: Apple scab is an important disease conventionally controlled by chemical fungicides, which should be replaced by more environmentally friendly alternatives. One of these alternatives could be the use of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. The objective of this work is to study the action of the three families of lipopeptides and different mixtures of them in vitro and in vivo against *Venturia inaequalis*. Firstly, the antifungal activity of mycosubtilin/surfactin and fengycin/surfactin mixtures was determined in vitro by measuring the median inhibitory concentration. Then, the best lipopeptide mixture ratio was produced using Design of Experiment (DoE) to optimize the composition of the culture medium. Finally, the lipopeptides mixtures efficiency against *V. inaequalis* was assessed in orchards as well as the evaluation of the persistence of lipopeptides on apple. In vitro tests show that the use of fengycin or mycosubtilin alone is as effective as a mixture, with the 50–50% fengycin/surfactin mixture being the most effective. Optimization of culture medium for the production of fengycin/surfactin mixture shows that the best composition is glycerol coupled with glutamic acid. Finally, lipopeptides showed in vivo antifungal efficiency against *V. inaequalis* regardless of the mixture used with a 70% reduction in the incidence of scab for both mixtures (fengycin/surfactin or mycosubtilin/surfactin). The reproducibility of the results over the two trial campaigns was significantly better with the mycosubtilin/surfactin mixture. The use of *B. subtilis* lipopeptides to control this disease is very promising.

Keywords: *Bacillus subtilis*; lipopeptides; surfactin; mycosubtilin; fengycin; *Venturia inaequalis*; apple scab; biopesticide

1. Introduction

Apple scab is the most important disease affecting apple orchards worldwide, both in terms of control and commercial losses [1–4]. The pathogen, *Venturia inaequalis*, is a hemibiotrophic ascomycete fungus with an asexual and a sexual cycle. The best time to infect apple trees is in the spring. Ejected ascospores germinate to form mycelium. This mycelium will multiply infections in the summer by asexual cycle. Then the sexual cycle starts again in autumn to protect itself from winter.

Fruits affected by the disease will not be marketable and affected trees will be weakened [3,5]. Despite the use of prophylactic methods (varietal choice), the application of

fungicides remains predominant. Apple scab can be controlled by the use of fungicides such as multisite fungicides (captan, copper), or single-site fungicides (succinate dehydrogenase inhibitor, demethylation inhibitors). However, more and more cases of resistance or reduced sensitivity to single-site fungicides have been reported worldwide [5–11]. This massive use of chemical fungicides has serious environmental consequences (pollution, residues, resistance). Moreover, in organic agriculture, apple scab can be controlled using copper or sulphur. Nevertheless, the excessive application of copper is responsible for important environmental concerns [12]. It is therefore essential to develop alternative control methods, such as biopesticides.

Several studies have investigated the use of biocontrol products to overcome resistance and pollution problems. Among these promising biocontrol products, *Bacillus* lipopeptides represent very good alternative to chemical pesticides. *Bacillus subtilis* is a Gram-positive bacterium from soil. The manipulation of its genome or specific feeding strategies makes it possible to act on the regulation and orientation of its metabolism towards the production of molecules of interest [13–18]. *B. subtilis* can produce lipopeptides by a non-ribosomal mechanism, which have interesting biological properties. Various studies have already shown the antimicrobial activities of these molecules [17,19–23]. There is a great diversity of these molecules, with more than 100 different structures [24]. These are classified into three distinct families according to their amino acid part: Fengycins (fengycins and plipastatins), Iturins (mycosubtilins, iturins and bacillomycins) and Surfactins (surfactins, pumilacidins, lichenysins). Surfactins are cyclic lipopeptides composed of 7 amino acid residues and a β -hydroxy fatty acid residue differing from each other in their peptide moieties and their fatty acid length. Surfactins are mainly known for their biosurfactant activity. Some studies have suggested an antifungal activity for surfactins against different fungi [23,25,26]. However, they are mostly known for a synergistic effect when combined with fengycin or mycosubtilin [23,27,28]. Moreover, studies have shown the existence of antiviral, antitumour, anticoagulant activities and stimulation of plant defense mechanisms [19,21,29–31]. Fengycins are composed of 10 amino acids (partially cyclic peptide) and of a β -hydroxylated lipid chain. According to the diversity of the peptide part, different subgroups have been identified: fengycin A and B, plipastatin A and B, and agrastatin A and B. These molecules have antifungal activities and are able to inhibit the growth of a large number of plant pathogens, especially filamentous fungi [23,32–37]. Iturins family consists of a group of cyclic lipopeptides composed of a heptapeptide moiety and a chain of fatty acids linked by an α -amino bond. These are known for their strong antifungal activity against pathogenic yeasts and fungi [22,32,38].

In addition to their individual activities, synergistic antifungal activities have also been reported for lipopeptide mixtures [23,28]. The production and use of lipopeptide mixtures therefore have several interests. Firstly, it allows the use of non-genetically modified strains, and secondly, it has been shown that certain lipopeptide families can act synergistically against phytopathogens. Synergistic effects have been demonstrated in vitro [32,39], but also in vivo against *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* or *Bremia lactucae* [28,40,41]. Production of lipopeptide families by *B. subtilis* is widely described in the scientific literature [24]. This production is strain-dependent and can be influenced by the growth conditions (pH, temperature, oxygen transfer and composition of culture medium). Fickers et al. (2008) have, for example, shown the impact of temperature on the production of mycosubtilin isoforms by the natural strain ATCC 6633 [42]. Studies on the production of surfactin and fengycin by the *B. subtilis* strain ATCC 21332, and its derivatives BBG21, had clearly shown that a high oxygen transfer favours the production of surfactin over fengycin and vice versa [43,44]. Carbon and nitrogen sources also have a significant impact on lipopeptide production.

For example, it was shown that the use of mannitol as a carbon source or a mixture of urea and ammonium sulphate as a nitrogen source had a significant effect on the specific production of fengycin in *B. subtilis* ATCC 21332 derivatives [45]. Urea was also used as a nitrogen source to optimize the production of lipopeptides by *B. subtilis* SPB1 [46]. Other

authors have shown the impact of glycerol and arginine on lipopeptide production in wild type *B. amyloliquefaciens* OG [47]. Optimization of the culture medium for lipopeptide production through the use of experimental design (DoE) is a very effective method. The Plackett–Burman design was used to optimize lipopeptide production by *B. subtilis* S499 [48]. Response Surface Methodology (RSM) was carried out to optimize the production of iturin by *B. subtilis* BH072 [16] or the production of surfactin by *B. subtilis* BBG131 [49]. Taguchi experimental design was performed to enhance surfactin production by *B. subtilis* ATCC 21332 [50].

The main objective of this work is to study the interest of using lipopeptide mixture (i.e., fengycin/surfactin and mycosubtilin/surfactin) produced by different natural strains of *B. subtilis* to manage apple scab in Organic Agriculture. To achieve this objective, we first determined the in vitro efficacy of the three families of lipopeptide alone and of the ratios in these two different mixtures against *V. inaequalis*. Secondly, the culture medium was optimized in order to produce a fengycin/surfactin mixture (FS) with an effective ratio against apple scab. This production was then tested in orchards during 2 trial campaigns in comparison with another mixture of lipopeptides containing mycosubtilin/surfactin (MS) produced at a semi-industrial scale, a copper/sulphur treatment and a commercial preparation of *B. subtilis*'s spores. Finally, the persistence of the lipopeptides on the fruit was investigated. This scientific strategy is summarized in a schematic representation in Figure 1.

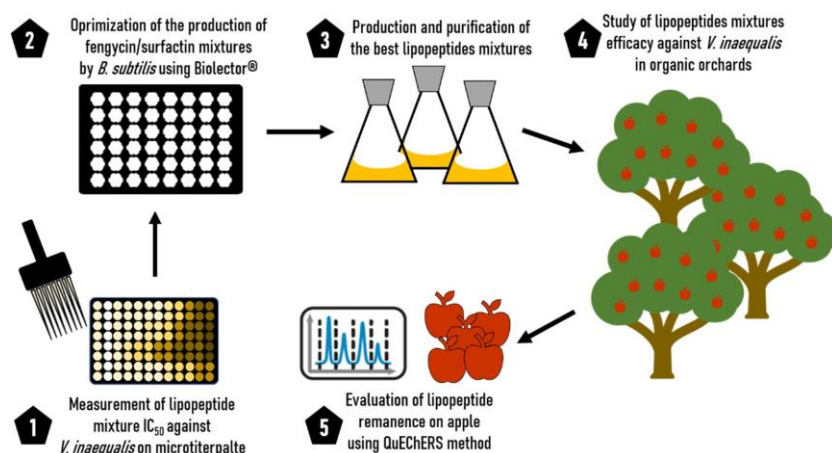


Figure 1. Schematic representation of scientific strategy developed in this work. Step 1: in vitro screening of the best lipopeptide mixture against *V. inaequalis*; Step 2: Optimization of the lipopeptide mixture production; Step 3: Production and purification of the different mixtures of lipopeptides in shacked flask; Step 4: Study of lipopeptide mixture efficiency against *V. inaequalis* in organic orchards; Step 5: Lipopeptide remanence evaluation using QuEChERS method.

2. Materials and Methods

2.1. Lipopeptide Production and Purification for In Vitro Antifungal Assays

The three families of lipopeptides (surfactin, fengycin and mycosubtilin) used to performed the in vitro experiments against *V. inaequalis* are presented in Table 1, they were produced and purified using genetically modified mono-producers strains of *B. subtilis* as recently described [51]. These experiments are presented in the following paragraph.

Table 1. Lipopeptides used in this study, their ratios and purity.

Lipopeptide(s)	Ratios (%)	Code	Purity (%)
Fengycin	100–0	F100	98
Fengycin–Surfactin	80–20	F80–S20	98–90
	60–40	F60–S40	
	50–50	F50–S50	
	40–60	F40–S60	
	20–80	F20–S80	
Surfactin	0–100	S100	90
Mycosubtilin	100–0	M100	75
Mycosubtilin–Surfactin	80–20	M80–S20	75–90
	60–40	M60–S40	
	50–50	M50–S50	
	40–60	M40–S60	
	20–80	M20–S80	
Surfactin	0–100	S100	90

2.2. In Vitro Experiments against *V. inaequalis*

The S755 strain of *V. inaequalis* is used to perform microplate assays [23,52]. A spore suspension in glucose peptone (1.43% glucose and 0.71% bactopectone) is obtained after 20 days of culture under malt agar medium in the dark. Lipopeptide activity is assessed by a 96-well microplate assay in liquid medium. Powdered lipopeptides are solubilized by adjusting for 100% purity in dimethyl sulfoxide (DMSO 100%) at a concentration of 60 g/L. After solubilization, two types of mixtures, fengycin–surfactin (FS) and mycosubtilin–surfactin (MS) are made with various mass proportions 100%, 80–20%, 60–40% and 50–50% (Table 1). A range of 15 concentrations in glucose peptone culture medium is performed according to the modalities in the Table 1. Each concentration is distributed in six wells per line with 140 µL per well. The spore suspension of *V. inaequalis* is distributed in four wells per line with 60 µL per well. The first two wells have only 60 µL of glucose peptone culture medium and are used as controls. The microplate is sealed and shaken at 140 rpm for 6 days at 20 °C in the dark. After six days of incubation, OD values are obtained by a microplate reader at 365 nm. A non-linear regression is used to determine the median inhibitory concentration (IC₅₀).

2.3. Medium Optimization for the Production of a Mix Fengycin/Surfactin by *B. subtilis* ATCC 21332

In order to produce the best FS mixture, *B. subtilis* ATCC 21332 strain was used. The objective of this work was to determine the best composition of the culture medium to produce a FS ratio close to 50–50% (as determined in in vitro experiments against *V. inaequalis*). DoE were used to optimize the culture medium on a base of Landy's medium as described previously [51].

According to the information found in the literature and our experience in lipopeptide production, we design an optimized full factorial plan involving four variables: the carbon source; the nitrogen source; the phosphate concentration; and the volumetric oxygen transfer coefficient. The first two variables are divided into three levels: three sources of carbon (glucose 40 g/L, mannitol 40 g/L and glycerol 40 g/L) and three sources of nitrogen (glutamic acid 5 g/L, arginine 1.48 g/L and a urea–ammonium mixture 1.6 g/L). The next two variables are in only two levels: two KH₂PO₄ concentrations (1 g/L and 2 g/L) and two different volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) values (86 h^{−1} and 135 h^{−1}). These variables were investigated to determine the most influencing parameters for the

production of fengycin, surfactin, biomass, specific fengycin production ($Y_{pf/x}$), specific surfactin production ($Y_{ps/x}$) and the best percentage of fengycin produced. The interactions between the variables were also investigated. The software Minitab® 18 (Minitab LLC, State College, PA, USA) was used to design this factorial plan and to analyze the results. This plan makes it possible to obtain 16 different media with 2 volumetric oxygen transfer coefficient conditions each, i.e., 32 conditions in triplicate, i.e., 96 samples instead of 108, for a complete non-optimized factorial plan.

All these experiments were conducted in triplicate using a Biolector® microfermentation system (m2p-labs GmbH, Baesweiler, Germany) in 48-well microtiter Flowerplates incubated during 72 h at 30 °C, 800 rpm and pH 7.0 buffered with 0.1 M MOPS [53]. In order to obtain the two different K_{La} , the wells are filled with either 800 μ L ($k_{La} = 135 \text{ h}^{-1}$ or 1.5 mL ($k_{La} = 86 \text{ h}^{-1}$) of culture medium [54]. Biomass, pH and dissolved oxygen were monitored on-line. Before the culture in Biolector® a preculture procedure was done. Briefly, a first preculture is made from a glycerol stock suspension on LB agar medium at 30 °C. Then, one colony of this culture on a Petri dish is subcultured to inoculate 5 mL of LB medium, incubated at 30 °C and shaken at 250 rpm for 24 h. This first liquid preculture is then used to inoculate a second preculture of 50 mL of Landy medium at pH 7 buffered with 0.1M MOPS in an Erlenmeyer flask and incubated at 30 °C under 160 rpm of agitation. This second pre-culture is stopped in the exponential growth phase ($OD_{600nm} < 4$) and used to inoculate the microtiter Flowerplates. After Biolector culture, culture broths were collected, the pH of each well was checked and adjusted to 7.0 with KOH if necessary, then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min. Supernatant were then analyzed by RP-HPLC, as described below.

2.4. Quantification of Lipopeptides Using RP-UPLC

Before analysis, the supernatant is diluted by half with ethanol and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min. Analysis was performed by RP-UPLC according to the recently described protocol [51]. Briefly, 10 μ L of each sample is then analyzed using ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with C18 column (UP5TP18-250/030 C18, Interchim, Montluçon, France) and coupled to a UV detector (detection at 214 nm). The mobile phase consisted of an acetonitrile/water/TFA gradient and at a flow rate of 0.6 mL/min. Lipopeptides were quantified using standards of surfactin and fengycin supplied by Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and standard of mycosubtilin supplied by Lipofabrik (Lipofabrik, Lesquin, France).

2.5. Lipopeptide Production for Orchard Trials

The different lipopeptide preparations tested in these trials were produced by two different *B. subtilis* strains. The natural strain *B. subtilis* ATCC 21332 was used to produce the FS mixture. The strain was grown in 5 L Erlenmeyer flasks in previously optimized medium at 30 °C, with 130 rpm agitation and a v/v ratio of 20% medium in Erlenmeyer flask, which results in a K_{La} around 100 h^{-1} , according to the equation proposed by Fahim et al. (2012) [43]. The composition of the culture medium used was as follows: glycerol, 40 g/L; glutamic acid, 5 g/L; yeast extract, 1 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; MgSO_4 , 0.5 g/L; KCl, 0.5 g/L; CuSO_4 , 1.6 mg/L; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 1.2 mg/L; MnSO_4 , 0.4 mg/L. The medium was buffered with 0.1 M MOPS at pH 7.0. After 72 h of culture, the lipopeptides were purified by a sequential process as developed by Coutte et al. [44] and more recently described in detail [51]. Briefly, the cells are firstly removed by a centrifugation step. The supernatant is then concentrated 10 times by an ultrafiltration step on a 10 kDa regenerated cellulose Hydrosart ultrafiltration membrane (Sartorius, Goettingen, Germany). Four water diafiltration steps follow to purify the lipopeptides retained by the membrane. Finally, a final ultrafiltration step in the presence of 70% (v/v) ethanol is performed, which allows to break the lipopeptide micelles and to pass them into the permeate. The ethanolic permeate containing the lipopeptides is then concentrated by evaporation of ethanol. A mixture

containing FS in solution was obtained. Concentration of this mixture was then adjusted at 250 mg/L of total lipopeptide in DMSO 0.1% before its use in orchards.

Another natural strain of *B. subtilis* selected by the company Lipofabrik was used to produce the MS mixture in a confidential industrial process. A mixture containing MS in solution (80–20%) was obtained. Concentration of this mixture was then adjusted at 500 mg/L of total lipopeptides in DMSO 0.1% before its use in orchards. The choice of this test concentration was guided by the supplier's recommendations.

In order to be applied for the protection of apple orchards, the lipopeptides treatments solutions are prepared as follows. Lipopeptide mixture solutions containing either fengycin (55%) and surfactin (45%) or mycosubtilin (80%) and surfactin (20%) were supplemented with adjuvant. Adjuvants were added extemporaneously before treatment at a concentration of 0.2% each. Heliosol® supplied by Actionpin (Actionpin, Castets, France) was used as adjuvant for the FS mixture and a combination of AEG and CMC supplied from Lamberti (Lamberti SPA, Gallarate, Italy) was used as adjuvant for the MS mixture.

2.6. Protection of Apple Trees against Scab

Lipopeptide mixtures were then evaluated in orchards to protect apple trees against natural infestation of *V. inaequalis*. The trials conducted in 2018 and 2019 are a grouping of seven modalities in a Fisher block design with four replicates and a water control. The elementary plots were composed of three trees of the Jonagold variety (several mutants evenly distributed) and a 'buffer' tree of the Jugala variety, in order to limit possible spray drift. Both varieties are highly susceptible to the disease. The trial was set up in the experimental orchard of FREDON Hauts-de-France on the site of Loos-en-Gohelle (F-62). Under natural conditions, this orchard represented a situation favorable to the disease, with significant rates of contamination by the disease in previous "classic" years. All the treatments were carried out as a preventive measure at a maximum rate of 7 days. Protection was renewed as soon as the threshold of 20 mm of rainfall was crossed.

Among the modalities tested in 2018, one plant protection product (SERENADE, *B. subtilis* str. QST 713) guided the evaluation programme towards an evaluation of the different substances during the period of primary contamination in the post-flowering situation, in order to respect the maximum number of applications. Protection against scab was achieved by means of copper and/or sulphur applications during the pre-flowering and flowering phase. For all the modalities (except for water control), a same pre-flowering treatment was applied as described in the Table 2.

Table 2. Summary of the modalities studied against apple scab in 2018.

Modalities	Pre-Flowering			Post-Flowering		
	Substances	Dose	Applications	Substances	Dose	Applications
M1 Water control	Water		T1 to T5	Water		
M2 Control Adjuvant Lipopeptides 1 (Fengycin/Surfactin)	Copper	1.5 kg/ha	T1 to T2	Adjuvant	2 L/ha	
M3 Control Adjuvant Lipopeptides 2 (Mycosubtilin/Surfactin)				Adjuvant		
M4 Lipopeptides 1 (Fengycin/Surfactin)	Sulphur	7.5 kg/ha	T3 to T4	55–45%	250 mg/L	T6 to T11
M5 Lipopeptides 2 (Mycosubtilin/Surfactin)				80–20%	500 mg/L	
M6 Biological reference		5 kg/ha + 1		Sulphur + Copper	5 kg/ha + 1 kg/ha	
(Cu/S)	Sulphur + Copper	kg/ha	T5			
M7 SERENADE				<i>B. subtilis</i> str. QST 713	2 kg/ha	

The seven modalities studied (Table 2) were a water control, the adjuvant control of the mixture of fengycin and surfactin, the adjuvant control of the mixture of mycosubtilin and surfactin, an organic farming reference (copper and/or sulphur), the SERENADE specialty (Bayer Crop Science), the modality of the mixture of mycosubtilin and surfactin, the modality of the mixture of fengycin and surfactin.

In 2019, the modalities were repeated, this time with protection applied over the entire period of primary infections using the lipopeptide mixtures. The seven modalities studied (Table 3) were a water control, the adjuvant control of the mixture of fengycin and surfactin, the adjuvant control of the mixture of mycosubtilin and surfactin, an organic farming reference (copper and/or sulphur), a modality based on fertilizer specialties (containing, in particular, copper), the modality composed of mycosubtilin and surfactin, and the modality composed of fengycin and surfactin.

Table 3. Summary of the modalities studied against apple scab in 2019.

Modalities	Substances	Dose	Applications
M1 Water control	Water	-	T1 to T12
M2 Control Adjuvant Lipopeptides 1 (Fengycin/Surfactin)	Adjuvant	2 L/ha	T1 to T12
M3 Control Adjuvant Lipopeptides 2 (Mycosubtilin/Surfactin)	Adjuvant	-	T1 to T12
M4 Lipopeptides 1 (Fengycin/Surfactin)	55–45%	250 mg/L	T1 to T12
M5 Lipopeptides 2 (Mycosubtilin/Surfactin)	80–20%	500 mg/L	T1 to T12
M6 Biological reference (Cu/S)	Copper	1.5 kg/ha	T1
	Sulphur	7.5 kg/ha	T2 and T4
	Sulphur + Copper	5 kg/ha + 1 kg/ha	T5 to T12
M7 Fertilizers	Copper	1.5 kg/ha	T1
	Fertilizer 1	2% to 4%	T2 to T4
	Fertilizer 2	8%	T5 to T12

2.7. Detection of Lipopeptide on Apple Using QuEChERS Method and Study of the Persistence of Lipopeptides

The analysis of lipopeptide residues was conducted on apples taken after the first trial campaign (2018) in the orchards described above. Twenty apples were harvested 45 days after the last treatment and were stored for 15 days at 4 °C before analysis. Control samples (untreated), samples treated with the MS mixture, samples treated with the FS mixture were analyzed. Among these 20 apples, 5 apples were randomly selected and the residues were extracted according to the QuEChERS method regulated by NF EN 15662 May 2018 [55]. Two types of matrix were distinguished, either the skin after peeling and grinding, or the apple flesh after grinding. This method is a versatile method for the determination of pesticide residues from plant material by GC-MS and LC-MS/MS with extraction/partitioning with acetonitrile. In our case, we replaced the cleaning step by adding PSA (Primary-Secondary Amine) with a step of Solid Phase Extraction (SPE) on a 1 g cartridge of C18 according to the diagram presented in Figure S1. After a concentration step using centrifuge evaporator (miVac, Gene Vac, Ipswich, UK) during 2 h at 40 °C, samples were analyzed by RP-UPLC-MS according to the protocol described below.

2.8. Quantification of the Lipopeptides by RP-UPLC and Mass Spectrometry (RP-UPLC-MS)

Fengycin, surfactin and mycosubtilin working standards were weighed out and dissolved in methanol/H₂O/formic acid (50/49.9/0.1) to prepare different solutions at concentration ranging between 0.02 µg/µL to 0.33 µg/µL for each lipopeptide in order to quantify lipopeptides ranging between 0.004 to 0.0666 mg of lipopeptides by kg of apple.

Dried samples were dissolved in 200 μ L of methanol/H₂O/formic acid (50/49.9/0.1) and centrifuged for 10 min at 8000 $\times$ g. A volume of 10 μ L of sample or calibrators were chromatographically separated at 30 °C on an ACQUITY UPLC BEH C18 column (130 Å, 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm, Waters Corporation) with the following acetonitrile gradient at 0.5 mL/min (the mobile phases consisted of solvent A (0.1% (v/v) formic acid/99.9% (v/v) water) and solvent B (0.1% (v/v) formic acid/99.9% (v/v) acetonitrile): from 35% to 50% solvent B over 10 min, from 50% to 90% solvent B over 5 min followed by washing and equilibrating procedures with respectively 95% and 35% solvent B during 5 min. The eluate was directed into the electrospray ionization source of the ACQUITY QDa mass spectrometer (Waters Corporation). The cone voltage and the capillary voltage were set to 15 V and 0.8 kV, respectively. MS data were collected for m/z values in the range of 30 and 1 250 Da with a sampling rate of 10 points/sec.

The RP-UPLC-MS data were analyzed with Empower 3 software (Waters Corporation). Quantification was performed with the m/z 753.44, 1072.69 and 1107.58. The ion of m/z 753.44, corresponding to the most intense ion detected for fengycin in the samples, is associated to the diprotonated isoform of fengycin A C19 or B C17. The ion of m/z 1072.69, corresponding to the most intense ion detected for surfactin in the samples, is associated to the sodium adduct of a C16 isoform. The ion of m/z 1107.58, corresponding to the most intense ion detected for mycosubtilin in the samples, is associated to the sodium adduct of a C17 isoform. Under this chromatographic condition, the retention times for these three ions were, respectively, 9.7, 16.3 and 5.0 min. Extracted chromatograms from these three ions were generated and integrated. To determine the concentration of the three lipopeptides in the different samples, the areas under the mass peak were taken to establish a linear or polynomial relation with concentration in standard (coefficient of determination (R^2) of 0.9969, 0.9887 and 0.9993, respectively).

2.9. Statistical Analysis

In the in vitro test on the efficiency of lipopeptides against *V. inaequalis*, six different wells of each modality were performed, the average of these six values is presented in Figures 2 and 3 as well as the confidence interval for each value.

The statistical analysis of the experimental design detailed in part 2.3 of the Materials and Methods section was carried out using Minitab® 18 software (Minitab LLC, State College, PA, USA). A two-sided 95% confidence interval was defined. Analysis of variance (ANOVA) and a linear factorial regression analysis were performed to evaluate the significant of each factor in the different output parameters (i.e., for the production of fengycin, surfactin, biomass, specific fengycin production ($Y_{Pf/X}$), specific surfactin production ($Y_{Ps/X}$) and the best percentage of fengycin produced). The quality of the linear regression model was analyzed using the Fisher F test and the coefficient of determination (R^2). Pareto plots, main effects and interactions are obtained on the standardized effects through analysis in Minitab® 18 software.

During orchard efficiency testing, several observations were made in orchards during the cycle of primary contamination of the disease. The last one took place after the release of the last stains from the primary contaminations. The notations were carried out on the three central trees of each elementary plot in the four repetitions of the test. In each elementary plot, 210 leaves were observed to count the number of leaves attacked. A leaf was considered attacked as soon as a stain appeared (all-or-nothing notation). This choice is justified by the fact that at this stage of the evaluation of lipopeptides, the primary objective was to observe the effectiveness against the disease and not the development of a control strategy with the assessment of the attack's severity. In total, the sampling effort focused on 840 leaves per modality distributed at the rate of seven shoots of 10 leaves per tree, distributed over the different leaf stages of the tree (top–middle–bottom).

From these observations, statistical analysis of variables and interpretation of results were done. Analyses of the effectiveness of the tested active substances were based on the percentage of leaves attacked by the disease. The sequence of analysis began with verifi-

cation of the realistic aspect of the trial, namely, its ability to provide useful data and the achievement of consistent results. After verifying a sufficient level of disease development in the water control modality and obtaining consistent results for the substances against the water control modality, the data were subjected to an analysis of variance. This analysis was followed by a test of Newman and Keuls to compare the preparations with each other (at the threshold $\alpha = 5\%$).

Comparisons of the different modalities tested were made regarding the reference modality of the test and the water control modality, to specify the level of contamination of the culture during the observations. To do this, the efficiency was calculated based on Abbott's efficiency calculation method: $\text{Efficiency} = 100 \times \frac{T_0 - T_i}{T_0}$ where T_0 = percentage of attack in the reference plot T_i = percentage of attack in the plot studied.

3. Results

The apple scab biocontrol trials in this work were carried out on an organic farming plot requiring the production of lipopeptides by natural non-genetically modified *B. subtilis* strains. In most cases, natural *B. subtilis* strains produce mixtures of several lipopeptide families (surfactin and fengycin or surfactin and iturin, or all three families together [24]). Previous work on the pathogen *V. inaequalis* has shown the good efficiency of fengycin (alone or in a mixture with surfactin) and of mycosubtilin (alone or in a mixture with surfactin) during in vitro experiments [23]. The choice therefore fell on the production of a mixture of FS and a mixture of MS.

As presented in Figure 1, the efficiency of the lipopeptide mixture ratio was first measured in vitro. In a second step, we optimized the production of the best FS ratio by the strain *B. subtilis* ATCC 21332 using a full factorial design plan. Then, this FS mixture of lipopeptides was applied in organic orchard to fight against apple scab and compared with MS mixture and conventional reference products. Finally, the remanence of lipopeptides on harvested and stored fruits was evaluated.

3.1. Antifungal Activities of the Mixture of Lipopeptides against *V. inaequalis*

The IC_{50} for the mixture FS at different proportions (w/w) is presented Figure 2. It can be observed that fengycin alone (F100) with an IC_{50} of 0.05 mg/L (0.03–0.07) presents a better antifungal activity against *V. inaequalis* S755 strain than surfactin alone (S100) with an IC_{50} of 6.38 mg/L (5.30–7.67). The mixtures F80–S20 (0.04 mg/L (0.03–0.05)), F60–S40 (0.05 mg/L (0.04–0.06)), and F50–S50 (0.08 mg/L (0.07–0.09)) have IC_{50} similar to fengycin alone. When the proportion of surfactin is higher than fengycin (F40–S60 0.23 mg/L (0.18–0.29) and F20–S80 0.17 mg/L (0.15–0.20)), the IC_{50} increases but remains lower than the IC_{50} of surfactin alone. From these results, the FS mixture 50–50% was selected for future experiments.

Figure 3 presents the IC_{50} for the MS mixture at different proportions. With an IC_{50} at 1.38 mg/L (1.15–1.68), mycosubtilin alone (M100) has a better activity than surfactin alone (S100) (4.79 mg/L (3.81–6.01)).

If one compares the surfactin results obtained in these two independent experiments (Figures 2 and 3), the results show that the IC_{50} of surfactin are slightly different, nevertheless the confidence intervals overlap. The M80–S20 mixture is the most efficient mixture with an IC_{50} of 0.83 mg/L (0.83–1.12). An increase in median inhibitory concentration can be seen for the last two concentrations containing the highest amount of surfactin. However, the mixtures M60–S40 (1.23 mg/L (1.16–1.29)), M50–S50 (1.73 mg/L (1.26–2.36)) and M40–S60 (1.42 mg/L (1.18–1.72)) have similar IC_{50} to each other and to mycosubtilin alone. With 2.70 mg/L (2.64–2.76), the M20–S80 mixture has an activity between M40–S60 and surfactin alone. From these results the MS mixture 80–20% was selected for future experiments.

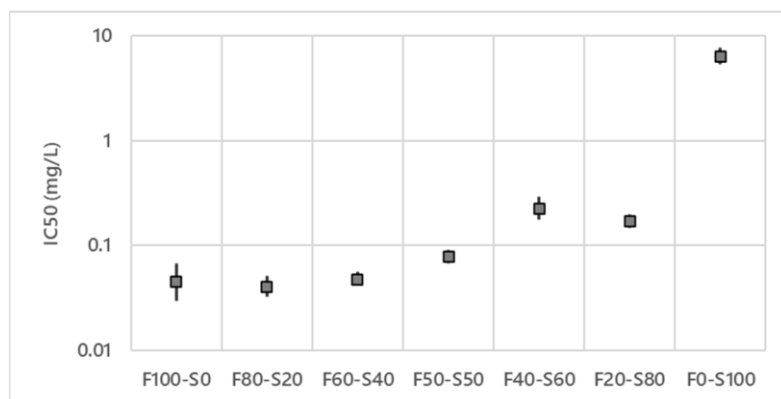


Figure 2. Effect of the lipopeptide ratios (w/w) on the IC₅₀ of fengycin/surfactin mixtures on *V. inequalis* S755 strain. IC₅₀ in logarithmic scale.

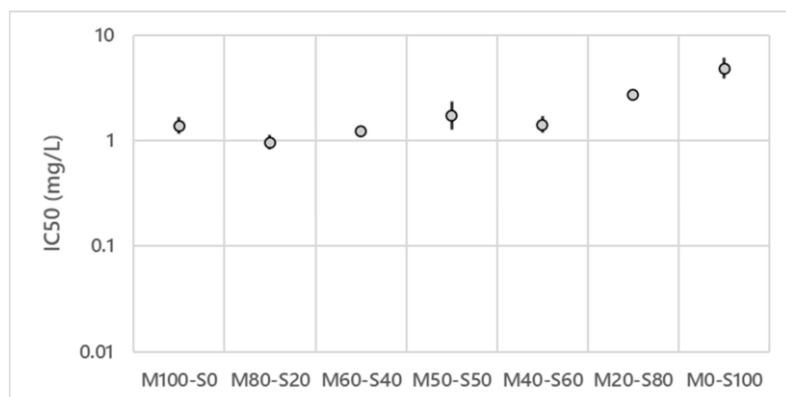


Figure 3. Effect of the lipopeptide ratios (w/w) on the IC₅₀ of mycosubtilin/surfactin mixtures on *V. inequalis* S755 strain. Logarithmic scale.

3.2. Medium Optimization Using DoE for the Production of Fengycin/surfactin Mixture by *B. subtilis* ATCC 21332

An optimized full factorial design was performed to determine the factors influencing the production of surfactin or fengycin in the *B. subtilis* ATCC 21332 strain and particularly the percentage of fengycin produced in relation to total lipopeptides (i.e., fengycin + surfactin). The different factors investigated were the carbon source (glucose, mannitol, glycerol), the nitrogen source (glutamic acid, arginine, urea + ammonium sulfate), the phosphate concentration (1 or 2 g/L) and the $K_L a$ (86 h⁻¹ or 135 h⁻¹). Design and analysis of the results were carried out using the Minitab[®] tool18. The results are presented in Figures 4 and 5.

In Figure 4, it can be observed that the three main factors (carbon or nitrogen sources and phosphate concentration) as well as the interaction between carbon and nitrogen sources have a significant impact on biomass production. Combinations between glucose/arginine or mannitol/urea + ammonium present the best biomass production over 5 g of DW/L (data not shown). The effect identified as significant on the final fengycin concentration, and its specific production is the interaction between the carbon source and nitrogen source factors (Figure 4). From these results, it can be also observed that the final fengycin concentration and the specific production of this lipopeptide are not necessarily significantly impacted by the same factors. Carbon source and phosphate concentration

alone have a significant impact on both, which is not the case of nitrogen source. Nitrogen source alone has a significant impact only on the specific production of fengycin, as well as K₁a. On the other hand, the fengycin concentration is also influenced by the interaction between the carbon source or nitrogen source and the phosphate concentration. However, these effects are less significant than the carbon x nitrogen interaction.

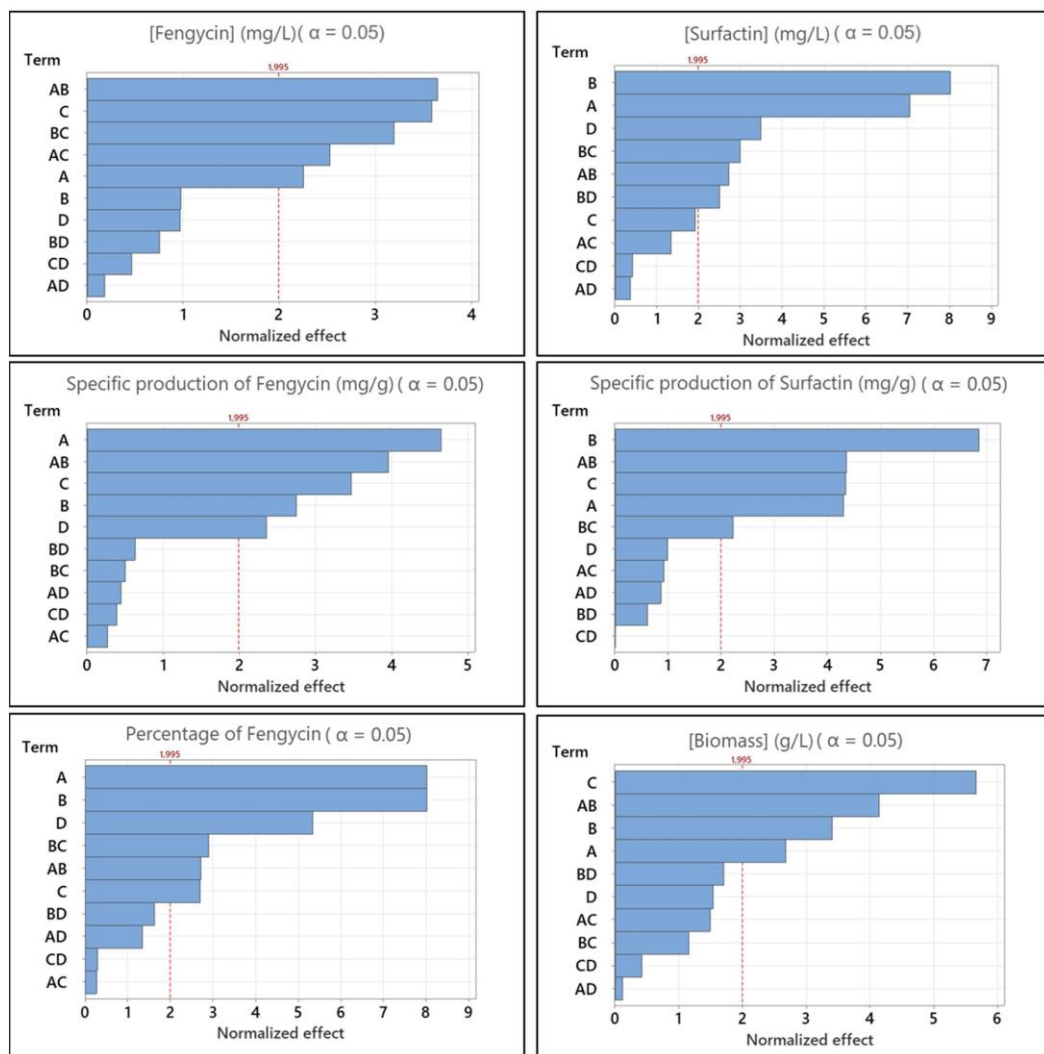


Figure 4. Pareto diagram of normalized effect for fengycin concentration, surfactin concentration, specific production of fengycin and specific production of surfactin, biomass production and percentage of fengycin produced in relation to total lipopeptides produced. A: carbon source; B: Nitrogen source; C: Phosphate concentration; D: K₁a.

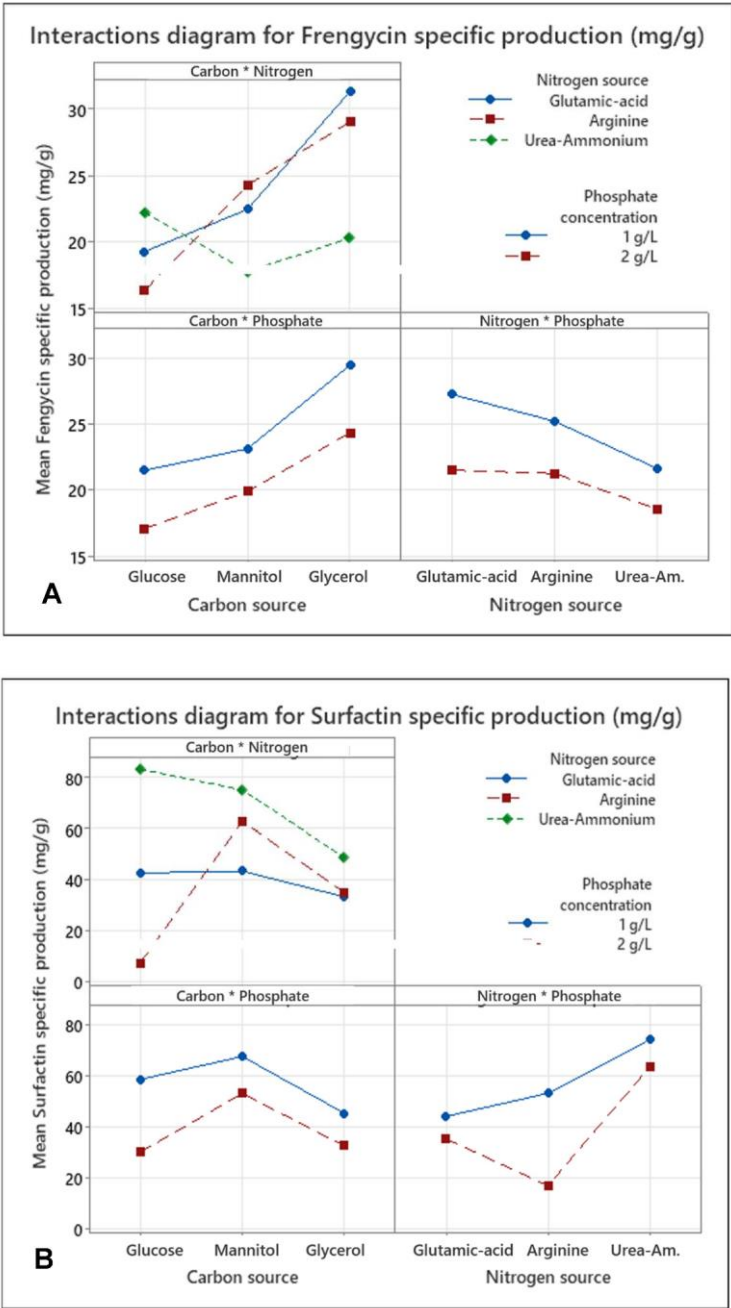


Figure 5. Cont.

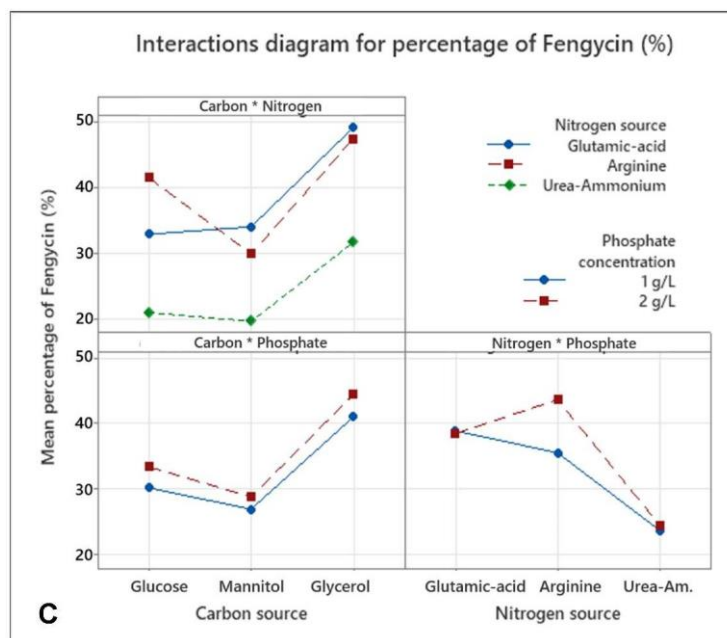


Figure 5. Interaction diagrams for (A) fengycin specific production, (B) surfactin specific production and for (C) Percentage of fengycin produced related to total lipopeptides. * indicates the interaction between the factors.

In order to further investigate the interactions and their effects on the fengycin specific production, interaction diagrams were made (Figure 5). The interaction between two factors is studied level by level. For the interaction between the two factors carbon source and nitrogen source, it turns out that the best option for specific production is the combination of glycerol as carbon source with glutamic acid as nitrogen source. For this same medium, the use of phosphate at a concentration of 1 g/L gives the best results. On the other hand, another combination, namely, glycerol, arginine and phosphate at 1 g/L, gives a result in specific production less important but close to that observed for this last medium.

These results show that mannitol has a positive effect on the specific production of fengycin compared to the reference composition of the Landy's medium (i.e., glucose, glutamic acid, phosphate at 1 g/L). It allows the latter to reach 21.5 mg/g compared to 19.3 mg/g for the control (glucose). Nevertheless, glycerol was found to have the best impact on fengycin specific production (26.9 mg/g). Glutamic acid and arginine present the best results on the fengycin specific production. With regard to the percentage of fengycin produced, the four factors have a significant importance with the carbon source and the nitrogen source having the same strong impact. Interestingly, the effect of K_2a is particularly important on this parameter, suggesting a good optimization lever. The interactions between the carbon and nitrogen sources, as well as between the nitrogen source and the phosphate concentration are also marked. Once again, the results presented in Figure 5 show that the best medium to increase the percentage of fengycin should contain glycerol as a carbon source (nearly 50% of fengycin produced).

However, the combination of glycerol with glutamic acid or arginine shows similar results. The phosphate concentration in these cases does not show much difference. Direct impacts of the different factors are presented in Figure S2.

The study of the main effects impacting the final surfactin concentration and its specific production shows that three of them are common: carbon source, nitrogen source

and the interaction of these two factors (Figure 4). On the other hand, two other effects, unique to each response, are significant: K_{1A} and phosphate concentration on the final concentration and surfactin specific production, respectively. The study of the interaction levels for specific surfactin production (Figure 5) reveals that the best medium composition corresponds to a combination of glucose with the urea + ammonium mixture and a phosphate concentration of 1 g/L. The use of this culture medium makes it possible to obtain an average specific production of surfactin of 83.3 mg/g compared to 42 mg/g for the control medium, i.e., an increase of approximately 2 times. The use of mannitol in combination with the urea + ammonium mixture gives also interesting results. On the other hand, the lowest productivity is observed for media using glycerol.

Based on these results, it was decided to produce the FS mixture by *B. subtilis* ATCC21322 using a medium composition as follow: glycerol, 40 g/L; glutamic acid, 5 g/L; KH_2PO_4 1 g/L, and others Landy medium components. Results of the production carried out in 5 L Erlenmeyer flask were 163 ± 23 mg/L for fengycin and 145 ± 31 mg/L for surfactin. These results were calculated on 6 different productions. Productions were pooled to obtain solution with a ratio of FS of 55–45 %. This result was very close to the expected one (i.e., 50–50%).

3.3. Protection of Apple Tree against Scab

The different lipopeptide mixtures were then tested in orchards during two trial seasons in 2018 and 2019 and compared to different modalities: a water control, adjuvant 1 and 2 modalities added during the spraying of the lipopeptide mixtures, a copper/sulphur modality and SERENADE® product. Analysis of variance was performed on the leaf and fruit data collected from the various scab surveys during the primary disease cycle. The results presented are based on the findings of the leaf analysis at the last survey, i.e., at the end of the primary scab infections.

3.3.1. Results from 2018 Trial

The 2018 results are presented in Figure 6. The analysis of variance carried out allows us to conclude with a high probability (p value = 0.02) that there are significant differences between the modalities studied. The different modalities are divided into two distinct statistical groups. The first group (A) alone includes the M1 water control modality with the highest rates of contamination on leaves by scab. The second group (B) is composed of the modalities with the lowest rates of contamination by scab, namely: the M7 SERENADE® modality, the M4 lipopeptides 2 modality composed of the mixture of MS, the M4 lipopeptides 1 modality composed of the mixture of FS and finally the M6 modality of biological reference.

Statistically, under the conditions of the 2018 study, the two modalities composed of a mixture of lipopeptides (M4 and M5) had a behaviour similar to the modality M6 of biological reference and M7 of Biocontrol (SERENADE®). The effectiveness of these two modalities (M4 and M5), although very similar, was not superior, at the end of the primary contaminations, to that of the reference modality (M6 or M7). During the primary post-flowering contaminations under the conditions of this trial, the efficacy of the lipopeptide mixtures was occasionally higher than the trial reference, ranging from 0 to 16% for the MS mixture and from 0 to 58% for the FS mixture. In contrast, it consistently ranged from 26 to 73% for the MS mixture and from 50 to 69% for the FS mixture, compared to the water control (data not shown).

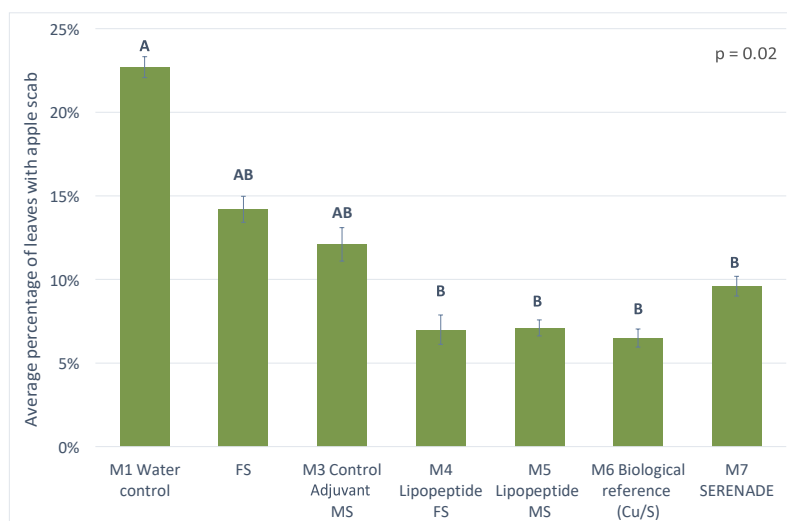


Figure 6. Graphical representation of the levels of leaf scab contamination in the different modalities following the 2018 trials at the end of primary contamination. The different statistical groups are represented by the letters A and B. A rating of AB indicates that this modality belongs statistically to groups A and B.

3.3.2. Results from 2019 Trial

The 2019 results are presented in Figure 7. The analysis of variance carried out allows us to conclude with a very high probability (p value < 0.001) that there are very highly significant differences between the modalities studied. The different modalities are divided into two distinct statistical groups. The first (A) includes the M1 water control, M2 lipopeptide 1 adjuvant control FS and the M4 lipopeptide 1 modality composed of FS. This group had the highest rates of leaf scab contamination in the test. In a second group (B), the modalities M6 biological reference, M7 fertilizer and the modality M5 lipopeptides2 composed of MS are combined. This group has the lowest levels of scab contamination. In the meantime, only the M3 adjuvant lipopeptide control MS belongs statistically to both groups. It is possible to observe a more effective behaviour, under the experimental conditions of the year, of the lipopeptide mixture composed of MS. This last modality showed a contamination rate comparable to the reference modality M6 of the trial.

The FS mixture, used at a lower concentration than the MS mixture, showed a slow and regular loss of efficacy during primary infections which certainly explains its low efficacy results in this trial (Figure S3). The efficacy of each of these two modalities, although dissimilar, was not higher at the end of the primary infections than the reference modality.

In contrast, the MS mixture showed a 35% higher efficacy than the reference at the very beginning of the disease cycle (Table S4). Compared to the water control, the MS mixture consistently showed a relatively constant efficacy ranging from 72 to 60%. The FS mixture, however, showed a decrease in efficacy over time from 68 to 22% at the end of the primary infections.

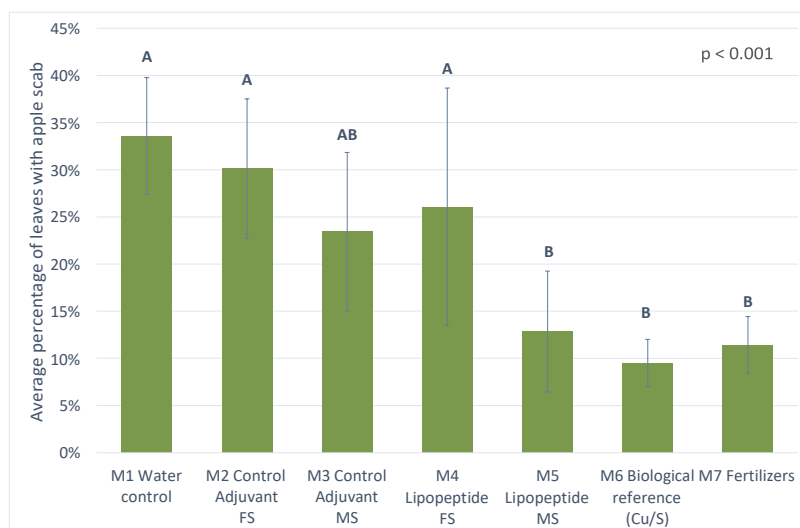


Figure 7. Graphical representation of the levels of leaf scab contamination in the different modalities following the 2019 trials at the end of primary contamination. The different statistical groups are represented by the letters A and B. A rating of AB indicates that this modality belongs statistically to groups A and B.

3.4. Study of the Persistence of Molecules after Spraying on Fruit Trees

QuEChERS method was first validated by adding powder of lipopeptides (surfactin, fengycin or mycosubtilin) to a crushed apple preparation before applying the QuEChERS method solid phase extraction in order to ensure that the three lipopeptides were well detected (data not shown). The calibration curves obtained for the three lipopeptides allowed to quantify them on skin and flesh of the different apples between 0.004 to 0.066 mg of lipopeptides by kg of apple. Quantification of the three families of lipopeptides was performed by RP-UPLC-MS to study the persistence of lipopeptides 45 days after the spraying on fruit trees. Control samples (untreated), samples treated with the MS mixture, samples treated with the FS mixture were analyzed. Quantification of lipopeptides is quite complex because of the numerous forms (the different protonated isoforms as well as the sodium or potassium adducts) detected by mass spectrometry. All the forms were analyzed in this experiment, but quantification was only performed on the most intense ions. Results are presented in Table 4.

Table 4. Quantification of fengycin, surfactin and mycosubtilin following extraction by the QuEChERS method in the different samples by RP-UPLC-MS ¹.

Modalities		Fengycin	Surfactin	Mycosubtilin
Control	Skin			
	Flesh			
Fengycin–Surfactin	Skin			
	Flesh			
Mycosubtilin–Surfactin	Skin			
	Flesh			

¹ Cells in black correspond to a concentration of corresponding lipopeptide superior to the acceptable threshold between 0.01 mg/kg and 0.03 mg/kg of apple, cells in dark grey to a concentration between 0.004 and 0.01 mg/kg of apple, cells in light grey to a concentration inferior to 0.004 mg/kg of apple and cells in white means that lipopeptide is not detected in these experimental conditions.

The results from the QuEChERS method, presented in Table 4, reveal the presence of only fengycin and surfactin on the skin of the apple; mycosubtilin is not present either on the fruit skin or in the flesh. The presence of fengycin in the skin and the flesh is below the acceptable threshold of 0.01 mg/kg plant material. However, surfactin was quantified at concentrations above the recommended limit for a treatment product in skin and flesh. Note that, for some replicates, the lipopeptide was not detected (data not shown). The differences obtained between the replicates come from the complexity of the apple matrix.

4. Discussion

4.1. In Vitro Antifungal Activities of the Lipopeptides Mixtures

The objective of this study was to find the best mixture of lipopeptides produced by a natural strain of *B. subtilis* in order to apply it in organic orchards to control *V. inaequalis*. Fengycin, mycosubtilin and surfactin show different antifungal activity against *V. inaequalis* ($F = 0.05$ mg/L (0.03–0.07); $M = 1.38$ mg/L (1.15–1.68); S of the mixture $FS = 6.38$ mg/L (5.30–7.67) or S of the mixture $MS = 4.79$ mg/L (3.81–6.01)). The results agree with [23] where similar activities were obtained for each lipopeptide ($F = 0.03$ mg/L; $M = 2.15$ mg/L; $S = 5.98$ mg/L). In addition, the antifungal activity of surfactin against *V. inaequalis* is confirmed as described in the literature [25,26]. FS and MS mixtures with a majority of fengycin or mycosubtilin show interesting but equally effective antifungal activity as 100% fengycin or 100% mycosubtilin. It has already been demonstrated that MS and FS mixtures have antifungal activities on different phytopathogens with synergetic effect [27,28,39,56]. The antifungal activity of different microorganisms against apple scab has already been studied at a lab scale or in field. Indeed, in vitro tests of isolates of *Pseudomonas*, *Trichoderma* and *Bacillus* show an inhibition of *V. inaequalis* [57,58]. Their antagonistic activity towards *V. inaequalis* is variable (11 to 58% inhibition for *Pseudomonas*, 100% for *Trichoderma* and 33 to 41% for *Bacillus*). Field studies have been conducted using *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. showed encouraging results in decreasing the incidence and severity on fruits and foliage [57]. Another microorganism, *Cladosporium cladosporioides*, showed an antagonistic effect, also by decreasing the incidence of apple scab on fruit and foliage [59,60]. All these works suggest the presence of secondary metabolites to explain the microorganism activity. The results of our study on purified lipopeptides show, without any doubt, the involvement of these molecules in the protection against apple scab. It also confirms the results we obtained in vitro [23]. The results on the ratio of the molecules when using a mixture of lipopeptides show the importance of being able to control and orient the metabolism of the strain for the production of the best mixture and thus increase the effectiveness of the biocontrol preparation. This type of lipopeptide mixture is found in many *Bacillus* biocontrol products [61].

4.2. Production of the Fengycin/Surfactin Mixture and Its Optimization by Design of Experiment

The results of the experimental designs show that fengycin production by the *B. subtilis* strain ATCC 21332 is significantly impacted by the carbon source. Glycerol and to a lesser extent mannitol allow the overproduction of fengycin compared to the use of glucose. These results are in agreement with a previous study in 2016, which shows that mannitol allows for the best productivity of fengycin compared to 11 other carbon sources using the strain BBG 21 [45]. They also go in the same direction as those presented the same year in another work, where the specific production of fengycin of the *B. amyloliquefaciens* 0G strain is better in a medium containing the glycerol–glutamic acid combination in comparison with a glucose–glutamic acid [47]. The impact of low $K_L a$ which favours fengycin production agrees the previously published results with BBG21 [43] and ATCC 21332 strains [44]. It is interesting to observe that the optimization results obtained at the mL scale were confirmed with only little deviation at the liter scale. These results are a reminder of the value of using DoE for medium optimization but also of the robustness of the high throughput system used here (i.e., Biolector® supplied by m2p-labs GmbH, Germany [62]). In terms of culture medium optimization, future studies are needed to optimize the concentrations of

the constituents identified in our study. The use of Response Surface Methodology will be considered, as we had previously done for the optimization of surfactin with another strain of *Bacillus* [49]. The use of glycerol as a carbon source can be part of a circular economy approach that allows this carbon source to be valorized. Recent studies have highlighted this aspect for the production of *Bacillus* lipopeptides [47,63,64]. Particular attention should however be paid to the grade of glycerol used, as this can have a direct impact on the profile of the fengycin isoforms produced and therefore in-fine the activity of the antifungal preparation [65].

4.3. Protection against Apple Scab

During the two different campaigns of this study, it was possible to observe a good behaviour of lipopeptide mixtures in the protection against apple scab. Specially, the lipopeptide mixture composed of mycosubtilin (80%) and surfactin (20%) at the dose of 500 mg/L showed a significant effectiveness, close to the reference (Cu/S), throughout the disease cycle. In contrast, the lipopeptide mixture of fengycin (55%) and surfactin (45%) at the lower dose of 250 mg/L appears to provide protection only under low disease pressure, as we observed during the 2018 trial, with the former diminishing at higher disease pressure. These results call in the first place for an increase in the dose of this preparation when treating orchards. This preparation is half as concentrated in lipopeptides as the mycosubtilin/surfactin preparation. In these results, it should be noted that the formulation adjuvants also have a slight effect against *V. inaequalis*, sharing the statistical groups with the modalities of mixture of control and lipopeptides. This very slight indirect effect is noticeable due to the relatively short duration of the 2018 trial. With the lengthening of the duration of the trial, this effect tends to disappear and is no longer perceptible like the tests conducted in 2019. The addition of the “adjuvant control” modalities allows us to ensure the direct protective effect of the substances tested. The antifungal action of this type of terpenic adjuvant has already been described in the literature, especially in combination with essential oils. Another important point is the formulation of these complex amphiphilic molecules which must remain on the leaves and not be washed away by the first rain. To solve this problem, the lipopeptides formulation must be further developed, either by optimizing the concentrations of the adjuvants we have used in this work, or by using other more effective sticker molecules. It is also necessary to study their integration into a disease control program. As shown by these first trials, protection against apple scab using lipopeptides alone still seems optimizable to date, with efficiencies often lower than the reference (i.e., Cu/S). Finally, the use of a mixture combining a very antifungal molecule such as mycosubtilin or fengycin with surfactin in orchard treatments can have many major advantages. The first is to benefit from the synergistic effect against the phytopathogen. The second is that surfactin could have a stimulating effect on plant defence, as demonstrated in other plants [31]. This has not been reported in apple against *V. inaequalis* but it is a promising way of study for future studies on this pathosystem. The third is to provide an additional insecticidal effect against one of the main pests of apple trees. Indeed, in a recent study, authors have shown that surfactin displayed an aphicidal activity against *Dysaphis plantaginea* or *Aphis fabae* even at low concentration [66,67].

4.4. Persistence of Lipopeptides on Apple Fruits

The persistence of the different lipopeptide mixtures was evaluated 15 days after fruit harvest. The results from the QuEChERS method did not reveal the presence of mycosubtilin either on the fruit skin nor in the flesh. However, fengycin and surfactin were found. The quantification of lipopeptides from apple extract had already been carried out in work on the use of a *Bacillus subtilis* GA1 strain for the protection of fruit against *B. cinerea*, fengycin being the main lipopeptide found [68]. In our results, fengycin was only found in the flesh and skin at a concentration well below the detection limit of the method. Surfactin was recovered on the apple’s skin and flesh at a concentration above the recommended limit for a treatment product. The high surfactant activity of surfactin seems to allow it to

penetrate well into the fruit, which does not seem to be the case for the other two families of lipopeptides. This result is to be highlighted with regard to the known hemolytic power of surfactin but also to its known cytotoxicity against cells of the digestive system like Caco-2. A recent study shows that the IC_{50} is around 200 mg/L on these intestinal cells [69]. The results of remanence show values well below the cytotoxic thresholds.

5. Conclusions

Lipopeptides from *B. subtilis* have shown, for the first time, in vivo antifungal efficiency on *V. inaequalis* in orchard trials. These results are particularly impressive with mycosubtilin/surfactin mixture, allowing a reduction of the disease incidence by about 60%, and to a lesser extent with fengycin/surfactin mixture. It is also interesting to observe that surfactin has an antifungal effect against *V. inaequalis* even if it is 4 to 100 times less powerful than with the other two families of lipopeptides. Nevertheless, the combination of fengycin or mycosubtilin with surfactin may be of interest as it was demonstrated in vivo in this study for its synergistic effect, its potential as a resistance inducer but also its aphicidal activity.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10091810/s1>, Figure S1: Schematic representation of the QuEChERS method used to evaluate the persistence of the lipopeptides on fruit, Figure S2. Diagram of the mean effect on fengycin specific production, surfactin specific production and on the ratio Fengycin/Surfactin. Figure S3: Graphical representation of evolution of the percentage of scab leaves for each modality in 2019. Table S4: Percentage of spots and effectiveness (on the right) of the different modalities against apple scab on foliage compared to the reference of the trial (M6) in 2019.

Author Contributions: Conceptualization, F.C., J.M. and L.T.; Methodology, F.C., J.M. and L.T.; Investigation, A.L., L.T., A.H., J.P., C.D. and B.D.; Formal analysis, F.C., L.T., A.L., J.M. and B.D.; writing—original draft preparation, F.C., A.L. and L.T.; writing—review and editing, F.C., J.M., F.K., L.T., S.O., M.D. and P.J.; supervision, F.C., J.M., S.O.; project administration, F.C., F.K. and P.J.; funding acquisition, F.C., F.K. and P.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: These studies were carried out with the financial support of the ERDF (European Regional Development Fund) and the Hauts-de-France Region, as part of the Smartbiocontrol programme (BioProd and BioProtect) included in the INTERREG V France–Wallonia–Vlaanderen programme, the ALIBIOTECH programme and the AgriBioPOM project financed by the call for projects on agricultural systems and the environment in the Hauts-de-France Region and for Lipofabrik in 2019 and 2020 by the grant agreement of the SME instrument no. 849713 under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank students from Polytech-lille (Sarah Berrada, Alexis Delrue, Nadine Halabi, Sarah Klai, Julia Morieux, Raphaël Leroux, Margot Thiblet et Mélissa Legrand) for their participation in the optimization Landy medium for the production of lipopeptides by *B. subtilis* ATCC 21332 and for the validation of QuEChERS method, as well as Emeline Bertrand from Institut Charles Viollette and Thomas Delhez from University of Liège for their help in lipopeptide production. DoE and mass spectrometry analysis were performed on the REALCAT platform, funded by a French governmental subsidy managed by the French National Research Agency (ANR) within the framework of the “Future Investments” program (ANR-11-EQPX-0037). The Hauts-de-France region, FEDER, Ecole Centrale de Lille, and Centrale Initiatives Foundation are also warmly acknowledged for their financial contributions to the acquisition of the REALCAT platform equipment.

Conflicts of Interest: F.C. and P.J. from the University of Lille and University of Liège are also the two co-founders of Lipofabrik company, which markets mycosubtilin and other lipopeptides from *B. subtilis*. Arnaud Héquet was also part of Lipofabrik company. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- MacHardy, W.E. *Apple Scab: Biology, Epidemiology, and Management*; APS Press: St. Paul, MN, USA, 1996.
- Holb, I.J.; Heijne, B.; Withagen, J.C.M.; Gáll, J.M.; Jeger, M.J. Analysis of Summer Epidemic Progress of Apple Scab at Different Apple Production Systems in the Netherlands and Hungary. *Phytopathology* **2005**, *95*, 1001–1020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bowen, J.K.; Mesarich, C.H.; Bus, V.G.M.; Beresford, R.M.; Plummer, K.M.; Templeton, M.D. *Venturia inaequalis*: The Causal Agent of Apple Scab. *Venturia inaequalis*. *Mol. Plant Pathol.* **2011**, *12*, 105–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chatzidimopoulos, M.; Lioliopoulou, F.; Sotiropoulos, T.; Vellios, E. Efficient Control of Apple Scab with Targeted Spray Applications. *Agronomy* **2020**, *10*, 217. [\[CrossRef\]](#)
- Cordero-Limon, L.; Shaw, M.W.; Passey, T.A.; Robinson, J.D.; Xu, X. Cross-resistance between myclobutanil and tebuconazole and the genetic basis of tebuconazole resistance in *Venturia inaequalis*. *Pest Manag. Sci.* **2020**, *77*, 844–850. [\[CrossRef\]](#)
- Shirane, N.; Takenaka, H.; Ueda, K.; Hashimoto, Y.; Katoh, K.; Ishii, H. Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1301–1308. [\[CrossRef\]](#)
- Gao, L.; Berrie, A.; Yang, J.; Xu, X. Within- and between-Orchard Variability in the Sensitivity of *Venturia inaequalis* to Myclobutanil, a DMI Fungicide, in the UK. *Pest Manag. Sci.* **2009**, *65*, 1241–1249. [\[CrossRef\]](#)
- Li, X.; Li, H.; Yu, Z.; Gao, L.; Yang, J. Investigating the sensitivity of *Venturia inaequalis* isolates to difenoconazole and pyraclostrobin in apple orchards in China. *Eur. J. Plant Pathol.* **2021**, *161*, 207–217. [\[CrossRef\]](#)
- Villani, S.M.; Biggs, A.R.; Cooley, D.R.; Raes, J.J.; Cox, K.D. Prevalence of Myclobutanil Resistance and Difenconazole Insensitivity in Populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 1526–1536. [\[CrossRef\]](#)
- Xu, X.-M.; Gao, L.-Q.; Yang, J.-R. Are Insensitivities of *Venturia inaequalis* to Myclobutanil and Fenbuconazole Correlated? *Crop Prot.* **2010**, *29*, 183–189. [\[CrossRef\]](#)
- Yaegashi, H.; Hirayama, K.; Akahira, T.; Ito, T. Point mutation in CYP51A1 of *Venturia inaequalis* is associated with low sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *J. Gen. Plant Pathol.* **2020**, *86*, 245–249. [\[CrossRef\]](#)
- European Food Safety Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of Confirmatory Data Submitted for the Active Substance Copper (I), Copper (II) Variants Namely Copper Hydroxide, Copper Oxochloride, Tribasic Copper Sulfate, Copper (I) Oxide, Bordeaux Mixture. *EFSA J.* **2013**, *11*, 3235.
- Coutte, F.; Niehren, J.; Dhali, D.; John, M.; Versari, C.; Jacques, P. Modeling Leucine's Metabolic Pathway and Knockout Prediction Improving the Production of Surfactin, a Biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 1216–1234. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tan, W.; Yin, Y.; Wen, J. Increasing fengycin production by strengthening the fatty acid synthesis pathway and optimizing fermentation conditions. *Biochem. Eng. J.* **2021**, *177*, 108235. [\[CrossRef\]](#)
- Jiang, J.; Han, M.; Fu, S.; Du, J.; Wang, S.; Zhang, H.; Li, W. Enhanced Production of Iturin A-2 Generated from *Bacillus velezensis* T701 and the Antitumor Activity of Iturin A-2 against Human Gastric Carcinoma Cells. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2021**, *28*, 27. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao, X.; Han, Y.; Tan, X.-Q.; Wang, J.; Zhou, Z.-J. Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *J. Microbiol.* **2014**, *52*, 324–332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mizumoto, S.; Shoda, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 101–108. [\[CrossRef\]](#)
- Akpa, E.; Jacques, P.; Wathélet, B.; Paquot, M.; Fuchs, R.; Budzikiewicz, H.; Thonart, P. Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *91*, 551–561. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, X.; Lu, Z.; Zhao, H.; Bie, X.; Lü, F.; Yang, S. Antiviral Activity of Antimicrobial Lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj Against Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Vitro. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2006**, *12*, 373–377. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, M.; Wang, J.; Zhu, Y.; Liu, B.; Yang, W.; Ruan, C. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 1519–1529. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao, H.; Shao, D.; Jiang, C.; Shi, J.; Li, Q.; Huang, Q.; Rajoka, M.S.R.; Yang, H.; Jin, M. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 5951–5960. [\[CrossRef\]](#)
- Moyne, A.-L.; Shelby, R.; Cleveland, T.E.; Tuzun, S. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 622–629. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Desmyttere, H.; Deweer, C.; Muchembled, J.; Sahmer, K.; Jacquin, J.; Coutte, F.; Jacques, P. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jacques, P. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* Spp. In *Biosurfactants*; Soberón-Chávez, G., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; Volume 20, pp. 57–91.
- Krishnan, N.; Velramar, B.; Velu, R.K. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *155*, 101–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mnif, I.; Ghribi, G. Lipopeptide Surfactants: Production, Recovery and Pore Forming Capacity. *Peptides* **2015**, *71*, 100–112.

27. Liu, J.; Hagberg, I.; Novitsky, L.; Hadj-Moussa, H.; Avis, T.J. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biol.* **2014**, *118*, 855–861. [\[CrossRef\]](#)
28. Deravel, J.; Lemi re, S.; Coutte, F.; Krier, F.; Van Hese, N.; Béchet, M.; Sourdeau, N.; H fte, M.; Leprêtre, A.; Jacques, P. Mycosubtilin and Surfactin Are Efficient, Low Ecotoxicity Molecules for the Biocontrol of Lettuce Downy Mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6255–6264. [\[CrossRef\]](#)
29. Ben Ayed, H.; Nasri, R.; Jemil, N.; Ben Amor, I.; Gargouri, J.; Hmidet, N.; Nasri, M. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21 and evaluation of their in vitro anticoagulant activity. *Chem. Interactions* **2015**, *236*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
30. Mnif, I.; Ghribi, D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* **2015**, *104*, 129–147. [\[CrossRef\]](#)
31. Cawoy, H.; Mariutto, M.; Henry, G.; Fisher, C.; Vasilyeva, N.; Thonart, P.; Dommes, J.; Ongena, M. Plant Defense Stimulation by Natural Isolates of *Bacillus* Depends on Efficient Surfactin Production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2014**, *27*, 87–100. [\[CrossRef\]](#)
32. Ongena, M.; Jacques, P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 115–125. [\[CrossRef\]](#)
33. Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2667–2679. [\[CrossRef\]](#)
34. Falardeau, J.; Wise, C.; Novitsky, L.; Avis, T.J. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 869–878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Roy, A.; Mahata, D.; Paul, D.; Korpole, S.; Franco, O.L.; Mandal, S.M. Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Gao, L.; Han, J.; Liu, H.; Qu, X.; Lu, Z.; Bie, X. Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* pB2-L and their effects on microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2017**, *110*, 1007–1018. [\[CrossRef\]](#)
37. Fan, H.; Ru, J.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Li, Y. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiol. Res.* **2017**, *199*, 89–97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Singh, P.; Xie, J.; Qi, Y.; Qin, Q.; Jin, C.; Wang, B.; Fang, W. A Thermotolerant Marine *Bacillus amyloliquefaciens* S185 Producing Iturin A5 for Antifungal Activity against *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Farzaneh, M.; Shi, Z.-Q.; Ahmadzadeh, M.; Hu, L.-B.; Ghassempour, A. Inhibition of the *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Contamination on Pistachio Nut by Fengycin and Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* UTBSP1. *Plant Pathol. J.* **2016**, *32*, 209–215. [\[CrossRef\]](#)
40. Mejri, S.; Siah, A.; Coutte, F.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Tisserant, B.; Krier, F.; Jacques, P.; Reignault, P.; Halama, P. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *25*, 29822–29833. [\[CrossRef\]](#)
41. Toral, L.; Rodríguez, M.; B jar, V.; Sampedro, I. Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1315. [\[CrossRef\]](#)
42. Pickers, P.; Leclère, V.; Guez, J.-S.; Béchet, M.; Coucheney, F.; Joris, B.; Jacques, P. Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Res. Microbiol.* **2008**, *159*, 449–457. [\[CrossRef\]](#)
43. Fahim, S.; Dimitrov, K.; Gancel, F.; Vauchel, P.; Jacques, P.; Nikov, I. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresour. Technol.* **2012**, *126*, 1–6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Coutte, F.; Lecouturier, D.; Yahia, S.A.; Leclère, V.; Béchet, M.; Jacques, P.; Dhulster, P. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 499–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Yaseen, Y.; Gancel, F.; Béchet, M.; Drider, D.; Jacques, P. Study of the correlation between fengycin promoter expression and its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions and the impact on surfactin production. *Arch. Microbiol.* **2017**, *199*, 1371–1382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ghribi, D.; Ellouze-Chaabouni, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol. Res. Int.* **2011**, *2011*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
47. Etchegaray, A.; Coutte, F.; Chataign , G.; Béchet, M.; dos Santos, R.H.Z.; Leclère, V.; Jacques, P. Production of *Bacillus amyloliquefaciens* OG and Its Metabolites in Renewable Media: Valorisation for Biodiesel Production and p-Xylene Decontamination. *Can. J. Microbiol.* **2017**, *63*, 46–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Jacques, P.; Hbid, C.; Destain, J.; Razafindralambo, H.; Paquot, M.; De Pauw, E.; Thonart, P. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus Subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Presented as Volumes 77–79 of Applied Biochemistry and Biotechnology*; Davison, B.H., Finkelstein, M., Eds.; Applied Biochemistry and Biotechnology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1999; pp. 223–233.
49. Motta Dos Santos, L.F.; Coutte, F.; Ravallec, R.; Dhulster, P.; Tournier-Couturier, L.; Jacques, P. An Improvement of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* BBG131 Using Design of Experiments in Microbioreactors and Continuous Process in Bubbleless Membrane Bioreactor. *Bioresour. Technol.* **2016**, *218*, 944–952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Wei, Y.-H.; Lai, C.-C.; Chang, J.-S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 40–45. [\[CrossRef\]](#)

51. Vassaux, A.; Rannou, M.; Peers, S.; Daboudet, T.; Jacques, P.; Coutte, F. Impact of the Purification Process on the Spray-Drying Performances of the Three Families of Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 815337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Muchembled, J.; Deweer, C.; Sahmer, K.; Halama, P. Antifungal activity of essential oils on two *Venturia inaequalis* strains with different sensitivities to tebuconazole. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *25*, 29921–29928. [[CrossRef](#)]
53. Kensy, F.; Zang, E.; Faulhammer, C.; Tan, R.-K.; Büchs, J. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb. Cell Factories* **2009**, *8*, 31. [[CrossRef](#)]
54. Funke, M.; Diederichs, S.; Kensy, F.; Müller, C.; Büchs, J. The baffled microtiter plate: Increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 1118–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Tiryaki, O. Validation of QuEChERS method for the determination of some pesticide residues in two apple varieties. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2016**, *51*, 722–729. [[CrossRef](#)]
56. Romero, D.; De Vicente, A.; Rakotoaly, R.H.; Dufour, S.E.; Veening, J.-W.; Arrebola, E.; Cazorla, F.M.; Kuipers, O.P.; Paquot, M.; Pérez-García, A. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2007**, *20*, 430–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jimenez, M.; Castillo, F.; Alcal, E.; Morales, G.; Valdes, R.; Reyes, F. Biological Effectiveness of *Bacillus* Spp. and *Trichoderma* Spp. on Apple Scab (*Venturia inaequalis*) in Vitro and under Field Conditions. *Eur. J. Phys. Agric. Sci.* **2018**, *6*, 11.
58. Kucheryava, N.; Fiss, M.; Auling, G.; Kroppenstedt, R.M. Isolation and Characterization of Epiphytic Bacteria from the Phyllosphere of Apple, Antagonistic in vitro to *Venturia inaequalis*, the Causal Agent of Apple Scab. *Syst. Appl. Microbiol.* **1999**, *22*, 472–478. [[CrossRef](#)]
59. Köhl, J.J.; Molhoek, W.W.M.L.; Haas, B.B.H.G.-D.; De Geijn, H.H.M.G.-V. Selection and orchard testing of antagonists suppressing conidial production by the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2008**, *123*, 401–414. [[CrossRef](#)]
60. Köhl, J.; Scheer, C.; Holb, I.J.; Masny, S.; Molhoek, W. Toward an Integrated Use of Biological Control by *Cladosporium cladosporioides* H39 in Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Management. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 535–543. [[CrossRef](#)]
61. Saxena, A.K.; Kumar, M.; Chakdar, H.; Anuroopa, N.; Bagyaraj, D.J. *Bacillus* Species in Soil as a Natural Resource for Plant Health and Nutrition. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 1583–1594. [[CrossRef](#)]
62. Kensy, F.; Engelbrecht, C.; Büchs, J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: Evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microb. Cell Factories* **2009**, *8*, 68. [[CrossRef](#)]
63. Janek, T.; Gudiña, E.; Połomska, X.; Biniarz, P.; Jama, D.; Rodrigues, L.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules* **2021**, *26*, 3488. [[CrossRef](#)]
64. Sousa, M.; Melo, V.; Rodrigues, S.; Sant'Ana, H.B.; Gonçalves, L.R.B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 897–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. de Faria, A.F.; Stéfani, D.; Vaz, B.G.; Silva, Í.S.; Garcia, J.S.; Eberlin, M.N.; Grossman, M.J.; Alves, O.L.; Durrant, L.R. Purification and Structural Characterization of Fengycin Homologues Produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 Grown on Raw Glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 863–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Denoirjean, T.; Doury, G.; Poli, P.; Coutte, F.; Ameline, A. Effects of *Bacillus* lipopeptides on the survival and behavior of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *226*, 112840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Denoirjean, T.; Ameline, A.; Couty, A.; Dubois, F.; Coutte, F.; Doury, G. Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid. *Pest Manag. Sci.* **2021**, *78*, 929–937. [[CrossRef](#)]
68. Toure, Y.; Ongena, M.; Jacques, P.; Guirio, A.; Thonart, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 1151–1160. [[CrossRef](#)]
69. Kourmentza, K.; Gromada, X.; Michael, N.; Degraeve, C.; Vanier, G.; Ravallec, R.; Coutte, F.; Karatzas, K.A.; Jauregi, P. Antimicrobial Activity of Lipopeptide Biosurfactants Against Foodborne Pathogen and Food Spoilage Microorganisms and Their Cytotoxicity. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 561060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Chapitre 3

**Activités des lipopeptides et détermination
du mécanisme de résistance aux triazoles
ou à la fengycine**

1. Contexte de la résistance aux triazoles chez la souche Rs552 de *V. inaequalis*

L'utilisation des lipopeptides comme produits de biocontrôle semble prometteur. Nous l'avons démontré précédemment en montrant l'efficacité de mélanges lipopeptidiques en verger. L'emploi des lipopeptides a pour objectifs de réduire l'application de fongicides chimiques mais également de limiter l'apparition de résistance à ces mêmes produits. Comme nous l'avons précédemment introduit lors du chapitre 1, l'une des familles de fongicides les plus utilisés sont les triazoles et des cas de résistance ont été observés en verger (Cordero-Limon *et al.*, 2021; Villani *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2010; Yaegashi *et al.*, 2020) mais aussi *in vitro* (Shirane *et al.*, 1996; Vijaya Palani and Lalithakumari, 1999). Il est possible d'expliquer la résistance de *V. inaequalis* par trois mécanismes pouvant agir seuls ou couplés. Les trois mécanismes sont les suivants : La mutation du gène *Cyp51A* (Price *et al.*, 2015; Yaegashi *et al.*, 2020), la surexpression du gène *Cyp51A* (Villani *et al.*, 2016; Yaegashi *et al.*, 2020) et l'activité de pompes à efflux (Hulvey *et al.*, 2012; Price *et al.*, 2015). Ces trois mécanismes ont été décrits dans le chapitre 1 partie 2.5 page 17.

Dans des travaux précédents de l'équipe, deux souches de *V. inaequalis* (Rs552 et S755) ont montré des sensibilités différentes au tébuconazole, appartenant à la famille des triazoles: S755 étant considérée comme sensible et Rs552 comme étant de sensibilité réduite (Desmyttere *et al.*, 2019; Muchembled *et al.*, 2018). La souche Rs552 a un niveau de résistance compris entre 70 et 100 (Desmyttere *et al.*, 2019; Muchembled *et al.*, 2018). Ce niveau de résistance se détermine par un ratio entre le niveau d'activité d'une souche résistante et le niveau d'activité d'une souche sensible (Ex : $CI_{50} R/CI_{50} S$). L'étude de Desmyttere *et al.*, (2019) a également montré une sensibilité de la souche S755 envers la fengycine, la mycosubtiline, la surfactine et leurs mélanges (binaires ou ternaires). La souche Rs552 est résistante à la fengycine et à la surfactine mais montre une sensibilité à la mycosubtiline et aux différents mélanges des trois lipopeptides (Desmyttere *et al.*, 2019).

A la lumière de ces résultats, il peut être conclu que les mécanismes impliqués dans la résistance au tébuconazole et aux lipopeptides ne sont pas similaires.

L'objectif général de ce chapitre est donc d'amener de nouveaux éléments pour la compréhension de ces mécanismes. Pour cela, une caractérisation génétique a été faite pour vérifier les deux mécanismes pouvant expliquer la résistance aux triazoles. Ces mécanismes sont la présence de mutations ou une surexpression du gène *Cyp51A*. Par la suite une caractérisation biochimique et génétique a été entreprise pour vérifier le troisième mécanisme qui porte sur l'efflux des molécules antifongiques. Enfin une caractérisation lipidique et des activités antifongiques a été réalisée sur les souches de *V. inaequalis*. Celle-ci a pour but de voir si une différence de composition lipidique, et notamment des lipides localisés dans les membranes, pourrait expliquer une différence d'activité des lipopeptides. Le mode d'action de ces derniers est, comme

présenté dans le chapitre 1 partie 4 page 22, connu pour être lié à leur interaction avec la fraction lipidique de la membrane plasmique des organismes cibles.

Plus particulièrement, le chapitre ci-dessous va chercher à répondre aux objectifs suivants :

- Confirmer ou déterminer les activités antifongiques *in vitro* vis-à-vis des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552, de six lipopeptides produits par différentes souches de *Bacillus* (fengycine, mycosubtiline, iturine A, surfactine, lichénysine et pumilacidine), de quatre mélanges binaires de lipopeptides (fengycine couplée soit à l'iturine A, la surfactine, la lichénysine ou la pumilacidine) et de deux triazoles (tébuconazole et tétraconazole). Cette expérience a été menée avec différents objectifs : déterminer de potentielles nouvelles activités antifongiques de la lichénysine et de la pumilacidine, étudier la relation structure/activité de ces différentes familles, et déterminer s'il y a un mode d'action similaire au sein d'une même famille de lipopeptides telles que les iturines et les surfactines.
- Etudier le gène *Cyp51A* (mutation et surexpression) pouvant jouer un rôle dans la résistance aux triazoles à partir de données génomiques et d'analyses bioinformatiques.
- Etudier l'implication des pompes à efflux dans la résistance aux triazoles à partir d'analyses bioinformatiques et d'analyses d'activité antifongique en présence d'inhibiteur de pompes à efflux.
- Evaluer par microscopie optique et par microscopie électronique à transmission si les lipopeptides ont une influence sur la structure externe et interne du champignon.
- Déterminer la composition lipidique totale des souches de *V. inaequalis* de sensibilité différentes S755 et Rs552, afin de déterminer si la résistance est liée à des modifications de cette composition lipidique.
- Faire des essais d'extraction des membranes plasmiques des deux souches de *V. inaequalis* pour une caractérisation future.

Les travaux présentés dans ce troisième chapitre sont pluridisciplinaires et réunissent la collaboration de plusieurs équipes. La plupart des résultats obtenus font l'objet de la soumission d'une publication dans *Microbiological Research* qui est présentée au point 3 de ce chapitre. Des résultats n'ayant pas été valorisés dans cette publication ont été ajoutés à la suite dans ce même chapitre.

2. Résumé des principaux résultats obtenus

L'activité antifongique des lipopeptides et des deux triazoles a été déterminée par un test *in vitro* dans lequel différentes concentrations de lipopeptides ou de triazoles ont été mises en contact avec les spores des deux souches de *V. inaequalis*. La comparaison des activités a été effectuée sur base de la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) calculée à partir des courbes obtenues. Cette expérience a été réalisée

sur la fengycine, la mycosubtiline, l'iturine A, la surfactine, la pumilacidine, la lichénysine, quatre mélanges binaires (Fengycine/iturine A, surfactine, pumilacidine et lichénysine), le tébuconazole et le tétraconazole. La fengycine, la mycosubtiline, l'iturine A et la surfactine ainsi que les quatre mélanges présentent une activité antifongique significative sur la souche S755 sensible tandis que la pumilacidine et la lichénysine n'ont aucune activité. La fengycine seule est la plus active avec un niveau proche du tébuconazole et du tétraconazole. Sur la souche Rs552 de sensibilité réduite au tébuconazole, la fengycine, la pumilacidine et la lichénysine n'ont pas d'activité antifongique. La mycosubtiline, l'iturine A et le mélange fengycine/iturine A montrent une activité semblable au tébuconazole et tétraconazole. Toutes les modalités, sauf la mycosubtiline et l'iturine A, présentent une meilleure activité sur la souche sensible que sur la souche de sensibilité réduite.

La caractérisation génétique des deux souches de *V. inaequalis*, a consisté au séquençage et à l'étude de la structure du gène *Cyp51A*. Elle a permis de détecter une substitution d'une sérine en position 183 par une cystéine chez la souche sensible. Une étude par dynamique moléculaire et *docking* a permis de déterminer que cette mutation n'avait aucun effet sur la conformation de la protéine *Cyp51A* et donc ne devrait pas avoir d'impact sur le caractère sensible de la souche.

Une évaluation de l'expression du gène *Cyp51A* par RT-qPCR a permis de montrer que la souche Rs552 surexprime constitutivement cinq fois plus ce gène que la souche S755. Cette évaluation de l'expression du gène a été couplée à une analyse des sites de liaison de facteurs de transcription dans la région promotrice du gène *Cyp51A*. Les résultats montrent qu'il y a davantage de sites de fixation de facteurs de transcription chez la souche Rs552 (sept sites de fixation) que la souche S755 (trois sites de fixation). Ce surnombre est dû à deux insertions de 613 pb dans cette région promotrice de Rs552. Ces sites de fixation putatifs pourraient expliquer la surexpression du gène *Cyp51A*.

Enfin, le dernier mécanisme étudié est lié au rôle joué par les pompes à efflux de type ABC et MFS dans la résistance. Une analyse a été réalisée en étudiant la croissance du champignon en présence d'inhibiteurs de ces pompes et des fongicides (tébuconazole, tolnaftate ou fengycine). Un effet synergique a été observé entre le tébuconazole et certains inhibiteurs démontrant l'implication des pompes dans le mécanisme de résistance à ce triazole. La résistance de Rs552 est dû au couplage de l'efflux du tébuconazole par les pompes et à la surexpression du gène *Cyp51A*. L'analyse de l'expression du gène *Cyp51A* et de l'efflux par les pompes a été réalisée en présence de tébuconazole et de fengycine. L'expression du gène *Cyp51A* n'est pas induite par le tébuconazole et par la fengycine. Donc ce gène est exprimé de manière constitutive quelles que soient les conditions de croissance de la souche. L'analyse des pompes à efflux ne présente pas d'effets synergiques entre la fengycine et les inhibiteurs des pompes. Cela indique que la fengycine n'est pas effluée par les

pompes. Ces expériences ont confirmé qu'il n'y avait pas de liens entre la résistance aux triazoles et la résistance à la fengycine parmi les mécanismes testés.

Les observations microscopiques de l'effet des lipopeptides sur la morphologie du mycélium des deux souches démontrent qu'en présence de fengycine et de surfactine des sphérules sont observées. Ces sphérules sont des structures originales ressemblant à une vésicule gonflée pouvant aller jusqu'à l'explosion. Lors de l'éclatement de cette sphérule, le contenu cellulaire se vide ayant un effet néfaste pour la cellule fongique. En présence de mycosubtiline et d'iturine A, de légères modifications morphologiques semblent être présentes sans être au point des sphérules observées en présence de fengycine ou de surfactine. Ces observations montrent que les lipopeptides interagissent avec la membrane plasmique mais de manière différente selon leur structure.

Un des objectifs initiaux de ce travail était aussi d'étudier l'interaction des lipopeptides (et en particulier la fengycine) avec des membranes biomimétiques. Pour ce faire, différents essais d'extraction de la membrane plasmique ont été entrepris mais sans succès. Ces résultats d'extraction sont présentés dans les annexes de ce manuscrit (Annexe 5). En revanche, une analyse approfondie des lipides totaux a été entreprise (stérols totaux et acides gras totaux). Les phospholipides et les triglycérides ont de plus été analysés spécifiquement. Les stérols et les phospholipides sont les composants majeurs de la membrane plasmique. Les stérols peuvent affecter la fluidité membranaire et les phospholipides agir sur la fluidité et la formation de complexes protéiques permettant la signalisation intracellulaire. Des différences dans la composition de ces lipides ont été relevées. En effet, en composition relative, il y a un plus grand pourcentage d'ergosta-7,22-dien-3-ol chez la souche Rs552. De même quelques différences ont été mises en évidence pour les phospholipides. Comme une plus faible proportion relative de PI(C16 :0/C18 :1) et de LPE(C18 :1) chez Rs552. Mais aussi, quelques différences quantitatives chez les phospholipides. Une plus faible quantité de PC (C18 :1/C18 :3) chez Rs552 et à l'inverse une plus grande quantité de LPC(C16 :0), LPC(C18 :0) et LPE(C16 :0) chez Rs552. Les propriétés et l'organisation des domaines lipidiques de la membrane plasmique pourraient être affectées par ces légères différences dans les proportions ou quantités de lipides.

Les résultats concernant l'activité antifongique du tolnaftate, du tébuconazole, de la fengycine et de la surfactine ont fait l'objet d'un poster lors du congrès Plant BioProTech à Reims (France) du 28 juin au 1^{er} juillet 2022 : A. Leconte, J. Jacquin, J. Muchembled, M. Deleu, F. Coutte et P. Jacques. « Indication of the role of efflux pumps that may explain the reduced sensitivity to tebuconazole and reduced sensitivity to fengycin and surfactin in *V. inaequalis* ». De plus, la majorité des résultats de ce chapitre font l'objet d'un article soumis en avril 2024 et accepté le 20 juin 2024 dans le journal Microbiological Research. Cet article est repris dans son intégralité ci-après.

3. Deciphering the mechanisms involved in reduced sensitivity to azoles and fengycin lipopeptide in *Venturia inaequalis*

Aline Leconte^{a,b,c}, Justine Jacquin^a, Matthieu Duban^b, Caroline Deweer^a, Pauline Trapet^a, Frédéric Laruelle^d, Amaury Farce^e, Philippe Compère^f, Karin Sahmer^g, Valentin Fiévet^a, Alexis Hoste^c, Ali Siah^a, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui^d, Philippe Jacques^c, François Coutte^b, Magali Deleu^c and Jérôme Muchembled^a

^a JUNIA, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Plant Secondary Metabolites team, Charles Viollette Institute, F-59000 Lille, France

^b University of Lille, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Microbial Secondary Metabolites team, Charles Viollette Institute, F-59000 Lille, France

^c University of Liège, UMRt BioEcoAgro 1158-INRAE, Microbial Secondary Metabolites team, TERRA Teaching and Research Centre, Gembloux Agro-Bio Tech, B-5030 Gembloux, Belgium

^d Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (EA 4492), Université Littoral Côte d'Opale, CEDEX CS 80699, 62228 Calais, France

^e Université Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institut de recherche translationnelle sur l'inflammation, F-59000 Lille, France .

^f Laboratoire de morphologie fonctionnelle et évolutive, UR FOCUS, and Centre de recherche appliquée et d'enseignement en microscopie (CAREM), Université de Liège, Liège, Belgium.

^g Université Lille, IMT Lille Douai, Univ. Artois, JUNIA, ULR 4515 - LGCgE, Laboratoire de Génie Civil et geo-Environnement, F-59000, Lille, France

Corresponding author: Jérôme Muchembled (jerome.muchembled@junia.com); +33 3 28 38 48 01

3.1. Summary

Apple scab, caused by the hemibiotrophic fungus *Venturia inaequalis*, is currently the most common and damaging disease in apple orchards. Two strains of *V. inaequalis* (S755 and Rs552) with different sensitivities to azole fungicides and the bacterial metabolite fengycin were compared to determine the mechanisms responsible for these differences. Antifungal activity tests showed that Rs552 had reduced sensitivity to tebuconazole and tetraconazole, as well as to fengycin alone or in a binary mixture with other lipopeptides (iturin A, pumilacidin, lichenysin). S755 was highly sensitive to fengycin, whose activity was close to that of tebuconazole. Unlike fengycin, lipopeptides from the iturin family (mycosubtilin, iturin A) had similar activity on both strains, while those from the surfactin family (lichenysin, pumilacidin) were not active, except in binary mixtures with fengycin. The activity of lipopeptides varies according to their family and structure. Analyses to determine the difference in sensitivity to azoles (which target the CYP51 enzyme involved in the ergosterol biosynthesis pathway) showed that the reduced sensitivity in Rs552 is linked to (i) a constitutive increased expression of the *Cyp51A* gene caused by insertions in the upstream region and (ii) greater efflux by membrane pumps with the involvement of ABC transporters. Microscopic observations revealed that fengycin, known to interact with plasma membranes, induced morphological and cytological changes in cells from both strains. Sterol and phospholipid analyses showed a higher level of ergosta-7,22-dien-3-ol and a lower level of PI(C16:0/C18:1) in Rs552 compared with S755. These differences could therefore influence the composition of the plasma membrane and explain the differential sensitivity of the strains to fengycin. However, the similar antifungal activities of mycosubtilin and iturin A in the two strains indirectly indicate that sterols are probably not involved in the fengycin resistance mechanism. This leads to the conclusion that different mechanisms are responsible for the difference in susceptibility to azoles or fengycin in the strains studied.

Key words: *Venturia inaequalis*, azoles, lipopeptides, *Bacillus* sp., antifungal activity, lipids.

3.2. Introduction

Apple scab, caused by the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*, is the disease that causes the most agro-economic losses for apple growers. Scab affects the plant mainly during its growth, in particular the fruit and leaves. Symptoms on the fruit are visible in the form of black spots, making the fruit unmarketable (Bowen *et al.*, 2011). One of the fungicide families most commonly used against apple scab is the azoles (Cordero-Limon *et al.*, 2020). This family belongs to the group of demethylation inhibitors (DMIs) that target the biosynthesis of fungal sterols. Azoles target the C14-demethylase enzyme (CYP51) encoded by the *Cyp51A* gene, which is essential for the biosynthesis of sterols such as ergosterol (Price *et al.*, 2015; Villani *et al.*, 2016). Ergosterol is a component required for the regulation of cell membrane stability in eukaryotes and is considered a fingerprint of fungi (Ermakova and Zuev, 2017; Stephenson, 2010). Due to the frequent use of DMIs to control apple scab, few cases of fungicide resistance have been observed in orchards. Resistance to fenbuconazole (Xu *et al.*, 2010), to myclobutanil and difenoconazole (Villani *et al.*, 2015) and to tebuconazole (Cordero-Limon *et al.*, 2020) has been reported in *V. inaequalis*. Azole resistance is also well known in other fungi, such as *Penicillium digitatum* (Hamamoto *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2013), *Zymoseptoria tritici* (Cools and Fraaije, 2013) and *Puccinia tritici* (Stammler *et al.*, 2009) for example. As azoles inhibit the C14-demethylase enzyme by binding to it, several studies on the *Cyp51A* gene and its relationship with azole resistance have been carried out in several plant pathogenic fungi. Overall, three mechanisms could explain resistance to azoles (Price *et al.*, 2015): (i) the appearance of point mutations in the *Cyp51A* gene (Yaegashi *et al.*, 2020), (ii) increased expression of the *Cyp51A* gene (Villani *et al.*, 2016) and/or (iii) increased expression of genes coding for ABC efflux pumps (ATP-Binding Cassette) and MFS (Major Facilitator Superfamily) types efflux pumps (Hulvey *et al.*, 2012). Mutations in *Cyp51A* are the most frequently reported mechanism of resistance. Mutations involving amino-acid substitutions can alter the affinity between the fungicide and the targeted enzyme. Increased expression of the *Cyp51A* gene leads to an increase in the quantity of the C14-demethylase enzyme, thereby increasing sterol production. Finally, ABC transporters and MFS pumps give fungal cells the ability to reject undesirable molecules such as azoles. The efflux pump mechanism is responsible for multidrug resistance (MDR) conferring cross-resistance to fungicides from different chemical families (Price *et al.*, 2015). The level of resistance can vary depending on the fungicide family used. For strobilurins that inhibit fungal respiration, resistance (caused by the G143A substitution in the mitochondrial cytochrome b enzyme) is disruptive because fungal genotypes can be fully sensitive (wild type) or fully resistant within fungal populations (Cheval *et al.*, 2017). In contrast, in the case of azoles, resistance is 'progressive' as a gradient of resistance occurs within populations. Such resistance behaviour is often referred to as 'reduced sensitivity' rather than 'resistance', as only a decrease in fungicide sensitivity is observed and no complete resistance occurs in fungal populations in the field (Villani *et al.*, 2015). Despite the agro-economic importance of apple scab, the

molecular basis of azole resistance mechanisms in *V. inaequalis* is poorly studied and the efflux-pump-based mechanism has never been investigated.

In the current context of agroecology and sustainable agriculture, the search for alternatives to fungicides, such as the use of biochemical compounds, is widely encouraged (Falardeau *et al.*, 2013). Lipopeptides produced by *Bacillus* spp, beneficial soil bacteria, are promising biomolecules for controlling apple scab (Leconte *et al.*, 2022) and their use could potentially reduce or replace the use of synthetic chemical fungicides in orchards. Lipopeptides are biodegradable and have been shown to have antifungal activity (Desmyttere *et al.*, 2019; Moyne *et al.*, 2001) and properties that stimulate plant defence (Cawoy *et al.*, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2015). They have been shown to interact with membrane lipids and/or sterols (Aranda *et al.*, 2005; Deleu *et al.*, 2005, 2008; Maget-Dana and Peypoux, 1994). There are more than 1500 different lipopeptide structures divided into three main families: fengycins, iturins and surfactins (Jacques, 2011). Fengycins are composed of ten amino acids, eight of which form the peptide ring, and a β -hydroxy fatty acid chain. Iturins are composed of seven amino acids forming a lactam peptide ring with a β -amino fatty acid chain. Both fengycins and iturins can alter membranes by permeabilising them, forming ionic pores (Aranda *et al.*, 2005, 2023; Zakharova *et al.*, 2019). Finally, surfactins are heptapeptides, forming a lactone ring with a β -hydroxylated fatty acid chain. Highly amphiphilic, surfactins can interact with the membrane by inserting themselves into lipid bilayers but without forming pores (Ongena and Jacques, 2008).

In a previous work, two strains of *V. inaequalis* were examined for their sensitivity to tebuconazole and fengycin (Desmyttere *et al.*, 2019). Interestingly, strain Rs552 showed significantly reduced sensitivity to both molecules compared to strain S755. As azole fungicides and lipopeptides do not have the same mode of action, the objectives of the present study were to characterise the mechanisms of reduced sensitivity to azoles and fengycin in Rs552 and to verify whether there are common mechanisms involved in this reduction in sensitivity. In total, the antifungal activities of five lipopeptides and three binary mixtures, as well as two azoles, were tested against the two *V. inaequalis* strains Rs552 and S755. The effects of the fengycin lipopeptide on the morphology and structure of the mycelium were observed using light and transmission electron microscopy. In addition, the two strains were characterised for three mechanisms involved in reduced sensitivity to azoles, including mutations in the *Cyp51A* gene, increased expression of the *Cyp51A* gene and overactivity of the efflux pump, using biochemical, molecular and bioinformatics tools to elucidate the mechanisms of the reduced sensitivity of Rs552. Finally, a lipidomic analysis was carried out to determine whether resistance to azoles and

fengycin is linked to fungal lipid composition. The search strategy is shown in Figure article 2-1.

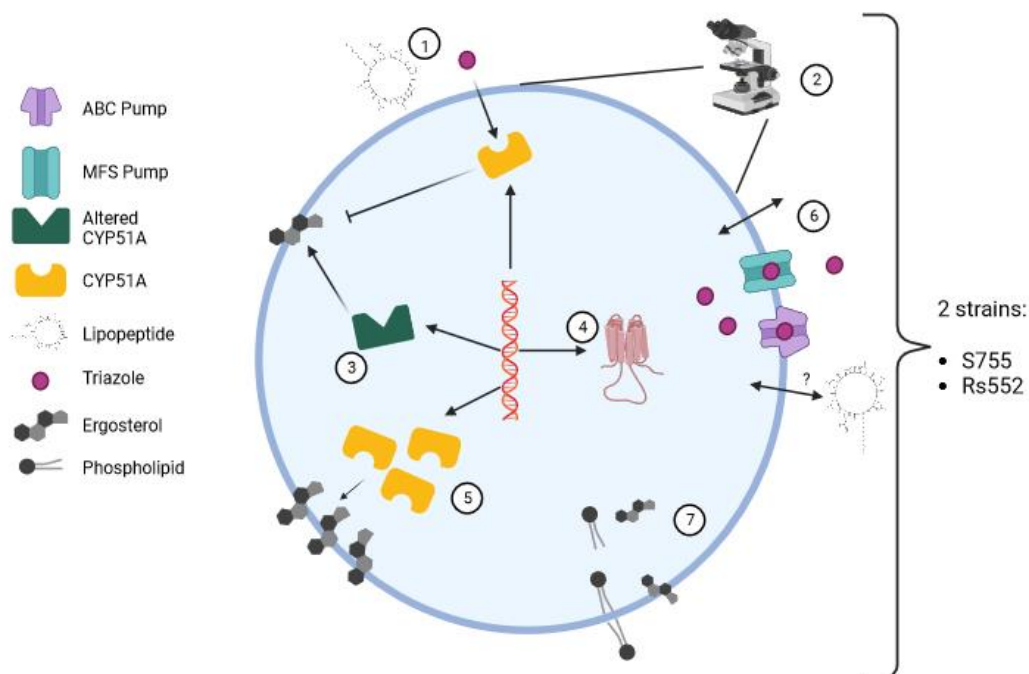


Figure article 2-1 : Schematic representation of the research strategy. 1: Study of the antifungal activity of lipopeptide and triazole; 2: Microscopic analysis; 3: Search for mutations in the *CYP51A* gene; 4: Analysis of *CYP51A* by docking and dynamics; 5: Study of *CYP51A* expression; 6: Study of efflux pumps; 7: Lipids analysis.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Fungal strains and culture conditions

Two strains of *V. inaequalis* were provided by the IRHS laboratory, INRA Angers, France, including S755, sensitive to tebuconazole, and Rs552, with reduced sensitivity to tebuconazole, as described by Muchembled *et al.* (2018). Solid culture of *V. inaequalis* was performed on Petri dishes supplemented with sterile malt agar medium containing 33.6 g/L malt agar extract and 2 g/L agar, while liquid culture of the fungus was performed in Erlenmeyer flasks supplemented with sterile glucose-peptone medium at pH 6.5, containing 14.3 g/L glucose and 7.1 g/L bacto-peptone. The two fungal strains were grown on solid malt agar medium in the dark at 20°C for 14 days, followed by six days under UV light (Wood light) at 20°C in order to induce fungal sporulation. These incubation conditions were applied for all experiments except the DNA extraction assay, for which incubation was undertaken for 20 days in the dark at 20°C. Spores suspensions at 10^5 spores/mL were used for other experiments. These were obtained by scraping Petri dishes with glucose-peptone

medium, then collecting the supernatant by filtration. The spores were filtered using a strainer and absorbent cotton. The strainer retained the pieces of mycelium, while the cotton allowed the spores to pass through. For the antifungal activity and microscopy tests, the spore suspension was used directly in the microplates. For the RNA and lipidomics experiments, the suspension was first inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks (90 mL medium and 10 mL spore suspension). The Erlenmeyer flasks were then incubated in the dark at 20°C and 140 rpm for 20 days (for RNA extraction) or 26 days (for lipidomic analysis). The incubation times for RNA extraction and lipidomic analysis were different, because in the first case we only needed a few pellets, whereas in the second we needed a lot. As the fungus does not produce a very large biomass, we had to "play" with the incubation times. The pellets were rinsed three times with sterile water and then collected by filtration on Büchner filter paper with Whatman®. The pellets were then recovered and immersed in liquid nitrogen. For RNA extraction, the fungal biomass was shredded and stored at -20°C, while for lipid extraction, the biomass was freeze-dried.

Genome of both strains were sequenced with 39x mean coverage. Draft genomes are composed of 4132 contigs for *V. inaequalis* S755 strain and 10001 contigs for *V. inaequalis* Rs552 strains with total sequence size of 64036957 pb and 57073897 pb respectively and GC content of 43.46% and 44.14% respectively. Assemblage statistics L50 and N50 are 509 and 37094 respectively for S755 strain and 1870 and 8804 respectively for Rs552 strain. Sequences of draft genomes were submitted to NCBI database with accession number JBBYAA0000000000 (S755) and JBBXZZ0000000000 (Rs552). Genomes size and GC content are highly similar to *V. inaequalis* strains genome parameters. Alignment of the draft genomes was carried out using Jspecies software (Richter *et al.*, 2016) and revealed that these two strains share 98% average nucleotide identity, with a bit score distribution of 1668 (Annexe 1 Fig. S1).

3.3.2. Production, purification, structural confirmation and quantification of lipopeptides

A total of five lipopeptides were used in this study, including fengycin (plipastatin), mycosubtilin, iturin A, lichenysin and pumilacidin. These lipopeptides were solubilised in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 60 mg/mL. The two genetically modified single-producer *Bacillus subtilis* strains Bs2504 and LBS1 were used to produce fengycin and mycosubtilin, respectively. The strain Bs2504 is derived from the strain 168 which is well known to possess a plipastatin production cluster. The production, purification and quantification of fengycin was carried out as described recently by Vassaux *et al.* (2021). Mycosubtilin was produced, purified, and kindly provided by Lipofabrik (Lesquin, France). The bacteria *B. velezensis* GA1, *B. licheniformis* BBG146-2, and *B. pumilus* QST 2808 were used to produce the lipopeptides iturin A, lichenysin and pumilacidin, respectively. These three bacteria were grown in lysogenic broth (LB)

medium (10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract and 10 g/L tryptone) at 37°C and 160 rpm overnight. In addition, the Landy medium was inoculated with these bacteria at an optical density of 0.1 at 600 nm in a flask filled to 10%. The Landy medium used for lichenysin production was modified by replacing glucose with 10 g/L xylose and 5 g/L sucrose. The inoculated flasks were then incubated at 37°C at 160 rpm for 48 h for *B. velezensis* GA1, and at 30°C at 160 rpm for 72 h for *B. licheniformis* BBG 146-2 and *B. pumilus* QST 2808.

Purification of lichenysin, pumilacidin and iturin A began with the harvesting of bacterial cells by centrifugation at 25,000g for 30 minutes at 4°C. The resulting supernatant was acidified to pH 2 with H₂SO₄ and incubated overnight at 4°C. The acidified supernatant was then centrifuged in 250 mL jars (13 000 rpm, 30 min, 4°C). The pellet was resuspended in H₂O and brought to pH 8 with NaOH. Liquid-liquid extraction was carried out using the same volume of a 7:3 ethyl acetate/butanol solvent mixture. The solvent phase was dried with a SpeedDry RVC 2-25 CD Plus (Martin Christ, Germany) to a volume of 5 mL. Lipopeptide purification was carried out using PuriFlash PF4250-250 preparative HPLC (Interchim, France). The gradients used for purification were acetonitrile (ACN) in water acidified with 0.1% (V/V) trifluoroacetic acid (TFA) (Figure article 2-2 AB). For iturin A, the gradient used was: 15 min at 20% acetonitrile (ACN), 15 to 35 min at 30% ACN, 35 to 55 min at 50% ACN, 55 to 95 min at 80% ACN, 95 to 105 min at 100% ACN and 105 to 125 min at 80% ACN. For lichenysin, the gradient used was: 10 min at 70% ACN, 10 to 70 min at 90% ACN, 70 to 80 min at 100% ACN and 80 to 90 min at 90% ACN. For pumilacidin, the gradient used was: 15 min at 60% ACN, 15 to 65 min at 85% ACN, 65 to 85 min at 100% ACN and 85 to 95 min at 85% ACN. Fractions containing only pure iturin A, lichenysin or pumilacidin were pooled and concentrated using a

SpeedDry RVC 2-25 CD Plus before freeze-drying with Alpha 3-4 LSCbasic (Martin Christ, Germany).

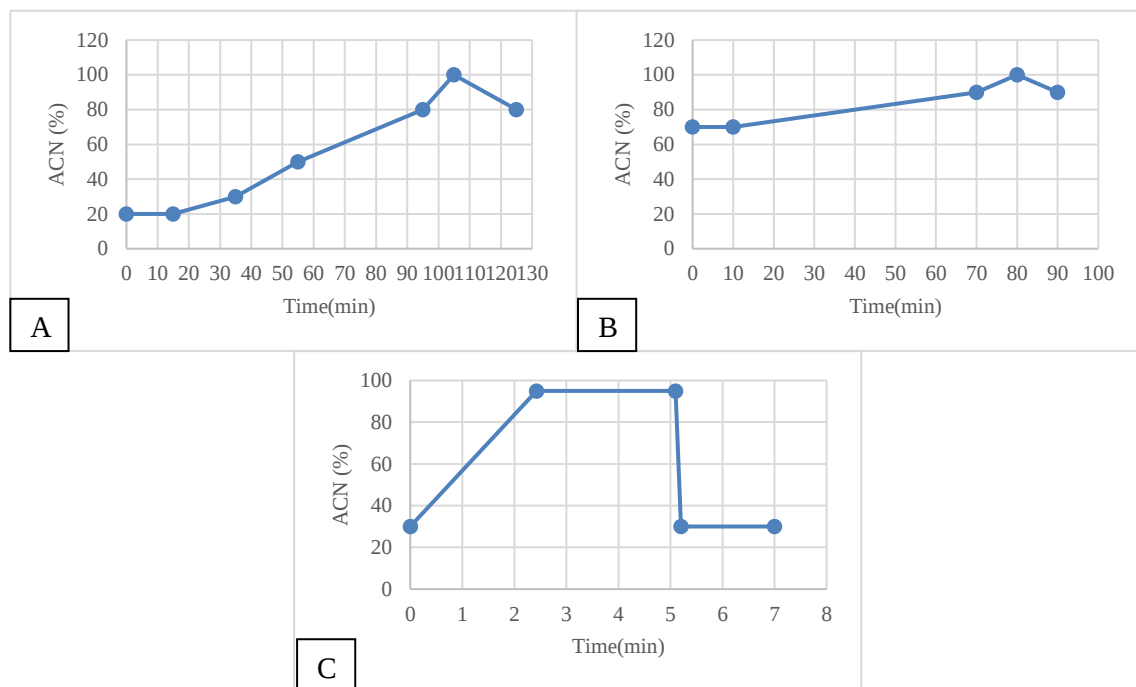


Figure article 2-2 : Acetonitrile (ACN) gradient used for lipopeptide purification. A, gradient for purification of iturin A; B, gradient for purification of lichenysin and pumilacidin; C, gradient for purification of fengycin and mycosubtilin.

Fengycin (plipastatin) and mycosubtilin were characterized by reverse phase-high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) using an Acquity H-class (Waters, Massachusetts, USA) coupled with a photodiode array (PDA) and an Acquity QDa mass spectrometer (Waters, as reported in Dussert *et al.* (2022), while iturin A, lichenysin, and pumilacidin were analyses as described below. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) was used to detect lipopeptides and confirm their mass, using an Acquity UPLC H-Class sample manager with a quaternary solvent manager and SQ detector (Waters, USA). Ten μL of sample was injected onto a Waters Acquity BEH C18 1.7 μm column (2.1x50 mm) with a C18 1.7 μm precolumn. The flow rate and temperature were set at 0.6 mL/min and 40°C. The gradient of ACN in water acidified with 0.1% (V/V) TFA was as follows (Figure article 2-2C): from 30% ACN to 95% ACN in 2.43 min, maintained at 95% ACN until 5.10 min, from 95% ACN to 30% ACN in 0.1 min and maintained at 30% ACN until the end of the run (7 min). Detection was carried out by electrospray in positive ion mode, using the following parameters: source temperature 130°C, desolvation temperature 400°C, nitrogen flow rate 1000 L/h and cone voltage

120 V. Data acquisition and processing were carried out using MassLynx, version 4.1.

For quantification, a Nexera ultra-high performance liquid chromatography with diode array detection UPLC-DAD (Shimadzu, Japan) was used with the same column, mobile phase and run parameters as the UPLC-MS used. The analysis spectrum used by the DAD was between 190 and 800 nm. A calibration curve for an external surfactin standard (Kaneka, Japan) and a fengycin or mycosubtilin standard (Lipofabrik, France) was used to compare the surface area of the surfactin, fengycin and iturin A molecules obtained. The purity of the molecules obtained was 98% for fengycin, 75% for mycosubtilin, 97% for iturin A, 98.5% for lichenysin and 77% for pumilacidin.

3.3.3. Biological tests on antifungal activity and efflux pump modulators

Tebuconazole, tetraconazole (triazole), tolnaftate (thiocarbamate) and three efflux pump modulators (EPMs) (amitriptyline hydrochloride, chlorpromazine hydrochloride and verapamil hydrochloride), purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, France), were used in the present study. These molecules were solubilised in 100% DMSO at 40 mg/mL for the fungicides and 50 mg/mL for the EPMs. The molecules tested were selected from the bibliography (Hayashi *et al.*, 2003; Leroux and Walker, 2013). Stock concentrations were determined to be the easiest to use, depending on the concentration range.

The antifungal activity of five lipopeptides (fengycin, mycosubtilin, iturin A, lichenysin and pumilacidin) and three binary mixtures (50/50, w/w) (fengycin/iturin A, fengycin/lichenysin and fengycin/pumilacidin), two azoles (tebuconazole and tetraconazole) and tolnaftate were evaluated against the two strains of *V. inaequalis* S755 and Rs552 using 96-well microplates in glucose-peptone liquid medium, as described in Desmyttere *et al.* (2019). A total of 15 concentrations were used for the lipopeptides evaluated (0.0026, 0.0051, 0.010, 0.021, 0.041, 0.082, 0.164, 0.328, 0.656, 1.31, 2.63, 5.25, 10.5, 21 and 42 mg/L) and fungicides (0.0017, 0.0034, 0.0068, 0.014, 0.027, 0.055, 0.109, 0.219, 0.438, 0.875, 1.75, 3.5, 7, 14 and 28 mg/L), as well as controls with no compound. The concentration ranges were determined on the basis of what had already been achieved in the laboratory, with a refocusing of concentrations to increase precision (Desmyttere *et al.*, 2019). The concentrations chosen are not related to those used in orchard trials. The experiment was repeated three times independently, with four biological replicates in each experiment.

For the efflux pump bioassays, two concentrations of EPMs without significant antifungal activity were used (4.5 and 7 mg/L). A pre-test was carried out to determine the IC₅₀s of the EPMs and then use the previous concentrations. This pre-test followed the same protocol as that described above. Tebuconazole, fengycin and tolnaftate were tested in combination with EPMs. Due to the different sensitivities of the two

strains to tebuconazole (and other fungicides), six concentrations per fungicide were tested, including three concentrations close to the IC_{50} of each strain, on both strains. The EPMs bioassays were carried out in liquid glucose-peptone medium in 96-well microplates. The EPMs were first mixed with the glucose-peptone medium, then each fungicide was added at specific concentrations. After six days of incubation, optical density values were recorded. The experiment was repeated three times independently, with six biological replicates in each experiment.

Interactions between EPMs and fungicides were analysed according to Colby (1967) by calculating the expected growth of the mixtures ($Exp = XF.XM / 100$), where XF and XM represent the percentage growth of the control for the fungicide and the EPM, respectively. Observed growth (Obs) is the percentage growth of the control for the mixtures. Interaction was determined by the ratio $IR = Exp/Obs$. The interaction between fungicides and EPMs was considered additive when $0.5 < IR < 1.5$, synergistic when $IR \geq 1.5$, or antagonistic when $IR \leq 0.5$ (Leroux and Walker, 2013).

3.3.4. Microscopic observations

The effect of fengycin on the mycelial morphology of both *V. inaequalis* strains S755 and Rs552 was assessed using light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Observations were made on samples of fungal mycelium taken from 96-well microplates supplemented with liquid glucose peptone medium and incubated for six days, prepared as described above. Three concentrations of fengycin were observed by light microscopy, namely 0.021 mg/L, 0.66 mg/L and 42 mg/L (corresponding respectively to the concentration around S755 IC_{50} ; an average concentration and the highest concentration tested). The last two concentrations were also used for TEM observations. In total, three samples were taken per concentration for each strain and compared with untreated controls. For light microscopy, microscope slides were prepared by depositing five μ L of lactophenol blue with five μ L of each fungal culture containing the mycelium, before being observed under a Nikon Eclipse 80i microscope supplemented by a Nikon Ddxm1200c digital camera. TEM observations were performed by fixing the contents of the microplate wells for 2 h, rinsing in 0.2 M cacodylate buffer, and postfixing for 1 h in 1% osmium tetroxide (OsO_4) in 0.1 M cacodylate buffer, followed by rinsing in MilliQ water. The bottom of the plate wells was then scraped with a metal spatula to suspend the contents. The contents were collected using a glass pipette and transferred to Eppendorf tubes. The samples were dehydrated in a series of ethanol, then acetone, before being embedded in AGAR 100 epoxy resin. The samples were centrifuged to decant between bath changes. The resin blocks at the bottom of the Eppendorf tubes were removed from the moulds and sawed into two parts, then reintegrated into the resin in flat silicone moulds. The resin capsules were then cut using a diamond knife mounted on a Sorvall Porter-blum MT2 B ultramicrotome. Ultrathin sections were cut at 80-100 nm and contrasted with Uranyless (Deltamicrocopies, Mauressac, France) for TEM observation (STEM Tecnai G2 twin operating at an accelerating voltage of 160 kV).

3.3.5. DNA extraction, PCR amplification and Sanger sequencing of the *Cyp51A* gene

DNA from both *V. inaequalis* strains S755 and Rs552 was extracted for whole genome sequencing and *Cyp51A* gene analyses. DNA was extracted from fungal strains grown on solid malt agar medium. The mycelium was scraped, frozen in liquid nitrogen and ground using a mortar and pestle. Eighty mg of fungal powder was resuspended in 300 μ L of PPI water (Water for injection) and sonicated for 20 minutes. DNA was extracted using a phenol/chloroform extraction method described previously (Siah *et al.*, 2010) and described in Figure article 2-3, with volumes doubled in order to obtain sufficient quantities of DNA for all analyses.

The *Cyp51A* gene and its putative promoter (upstream region) were amplified using the primers described in Annexe 1 Table S1. PCR reactions were performed using the following mixture: 0.2 μ L (20 μ M) of each primer, 4 μ L of dNTP (2.5 mM), 5 μ L of 10 X reaction buffer, 8 μ L (25 mM) of $MgCl_2$, 0.25 U of Taq polymerase (Fisher BioReagents™) and 5 μ L (1 ng/ μ L) of genomic DNA, all adjusted to a volume of 50 μ L with PPI water. PCR amplifications were performed in the Bio-Rad C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) with the following thermal cycling conditions:

- Denaturation 2 min at 95°C;
- 30 cycles of :
 - o Denaturation 30 s at 94°C,
 - o Hybridation 30 s at 57.5°C (*Cyp51A* gene) or 55.2°C (upstream region)
 - o Elongation 1 min at 72°C;
- Final elongation of 10 min at 72°C.

The amplicons obtained were sequenced by Genoscreen (Lille, France) using the Sanger method. A 1674 bp fragment of the *Cyp51A* coding sequence was concatenated by superimposing the amplified fragments using the BLASTn alignment search tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Sequences from the upstream region of *Cyp51A* from both strains were also aligned using BLASTn. Nucleotide and amino acid sequences were aligned using Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo). The resulting sequences were compared using Clustal Omega to the sequences of the myclobutanil (azole)-resistant strain Ent54 (ACC#AF262756) and the myclobutanil-sensitive strain Ent27 (ACC#AF227920), both reported by Schnabel and Jones (2001). These sequences were aligned using Clustal Omega with the sequences of the Ent54 and Ent27 strains. In addition, the final sequences obtained from the upstream region were aligned with the sequence of the sensitive strain 3a-27-10 (ACC#KT694303) reported by Villani *et al.* (2016). The GenBank accession numbers for nucleotide sequences are BankIt2770571 755

CYP51 OR909969 for S755 strain and BankIt2770571 552 CYP51 OR909970 for Rs552 strain.

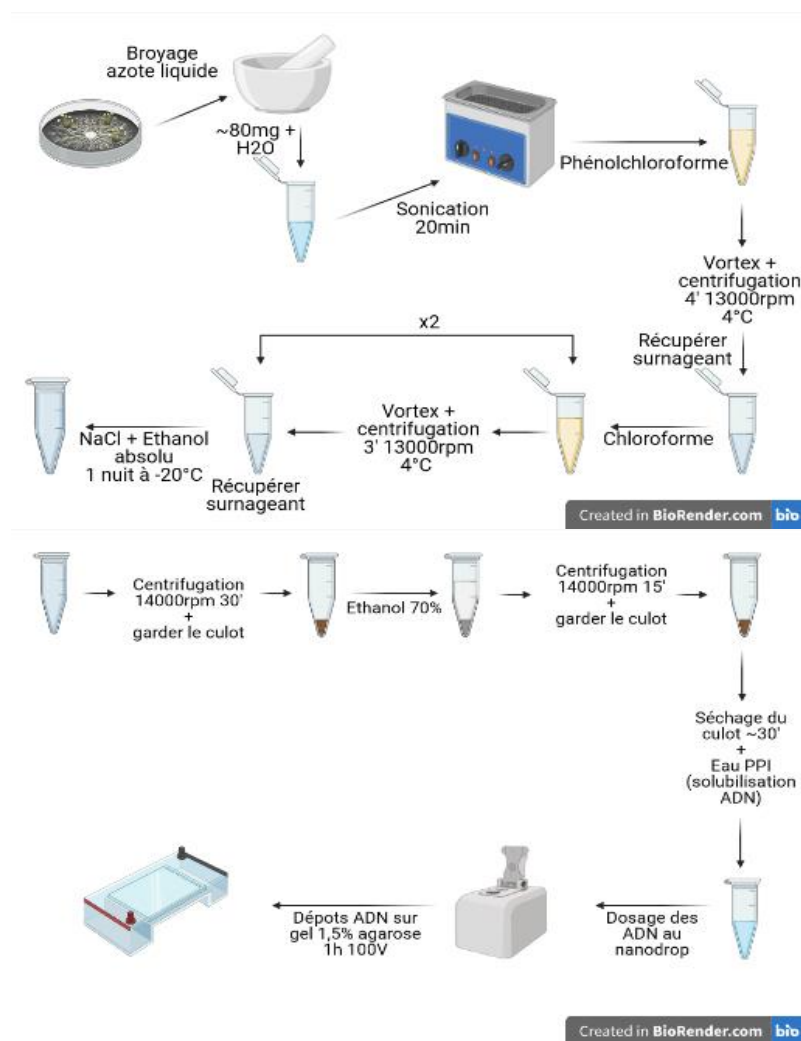


Figure article 2-3 : DNA extraction and purification protocol for *V. inaequalis* S755 and Rs552.

3.3.6. Docking and dynamics of the *CYP51A* protein

In silico dynamic and docking analyses were performed to assess the effect of the S183C substitution detected (in the *CYP51A* protein of the sensitive *V. inaequalis* strain S755) on affinity with the fungicide tebuconazole. We chose to build a putative structure by homology, in the absence of an experimental 3D structure of *CYP51A* from *V. inaequalis*. A BLAST on the RCSB Protein DataBank (PDB) retrieved a

number of structures, from which we retained the four with the highest sequence identity for further evaluation, all of which were within a reasonable 47.5%. A thorough inspection of the alignment was carried out to validate the choice of reference by closely monitoring the heme-binding residues. Mutants were obtained by mutating the corresponding residue in the *V. inaequalis* model. After assessing their potential effect on structure, a series of inhibitors were docked to GOLD (Jones *et al.*, 1995) and the binding site was defined as an 8 Å sphere around the tebuconazole position extracted from 5eac. Thirty poses were generated and their superposition in well-defined groups allowed us to determine the pose to be retained as the final solution. Another criterion was the score of the pose most representative of the clusters. To better understand the effect of strain S755 substitution, a 100 ns molecular dynamics run was performed in quadruplicate with the AMBER package (Case *et al.*, 2019) and the difference in interactions between strains S755 and Rs552 was assessed using Structural Interaction Network Analysis Protocols (SINAPs) (Bedart *et al.*, 2022).

3.3.7. Illumina whole genome sequencing and bioinformatics mapping of *Cyp51A* transcription factors and efflux pump genes

Whole DNA from both *V. inaequalis* strains was sequenced at MicrobesNG (microbesng.com) using Illumina MiSeq and HiSeq 2500 technology platforms, with paired-end reads ranging from 2 to 250 bp. The closest existing reference genome was determined using Kraken (Wood and Salzberg, 2014) and reads were mapped using the burrows-wheeler aligner (BWA) MEM algorithm (bio-bwa.sourceforge.net) to assess data quality. Reads were assembled de novo using SPAdes (cab.spbu.ru/software/spades).

Based on the Sanger sequences, transcription factor binding motifs in the upstream region of *Cyp51A* from the two *V. inaequalis* strains were identified using Multiple Em for Motif Elicitation Suite version 5.3.3 (MEME Suite) (Bailey and Elkan, 1994). The first analysis revealed motifs in the promoter sequences, using MEME and the motif alignment and search tool (MAST) with the following parameters: motif width of 6 to 15 bp, zoop pattern and classical mode. In addition, all motifs found were analysed using the Gene Ontology for Motifs (GOMo) (Buske *et al.*, 2010) in order to determine or suggest a biological role. In addition to the bioinformatics analyses performed to detect transcription factor binding motifs, a review of the scientific literature was used to find previously identified motifs (Figure article 2-8E). By using MAST to align motifs, it was possible to identify motifs with a known biological role. On the basis of the whole genome sequences obtained, the *ABC* and *MFS* efflux pump gene sequences were mapped on the draft genome of each strain using a local blast. Sequence variations in the target genes were identified by alignment using Clustal Omega.

The GenBank accession numbers for nucleotide sequences are BankIt2770571 755_MFS1 OR909971, BankIt2770571 552_MFS1 OR909972, BankIt2770571 755_ABC1 OR909973, BankIt2770571 552_ABC1 OR909974, BankIt2770571 755_ABC2 OR909975, BankIt2770571 552_ABC2 OR909976, BankIt2770571 755_ABC3 OR909977, BankIt2770571 552_ABC3 OR909978, BankIt2770571 755_ABC4 OR909979, BankIt2770571 552_ABC4 OR909980.

3.3.8. RNA extraction and analysis of relative *Cyp51A* gene expression by RT-qPCR

Cyp51A gene expression in both strains was assessed after 20 days of fungal incubation in liquid medium, in the absence and presence of tebuconazole or fengycin at the same concentrations for each inhibitor (Rs552, 0.4 mg/L; S755, 0.005 mg/L). RNA was extracted from the ground (mortar and pestle) and stored biomass of the two *V. inaequalis* strains. For each extraction, 80 mg of pellet powder was used. Extraction was performed using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) with DNase treatment (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). RNA concentration was measured using a nanodrop. RNA quality was assessed using a 1.5% agarose gel in 1 X TAE to check RNA integrity.

To determine the relative expression of *Cyp51A*, cDNA synthesis was performed using the iScriptTM Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad Laboratories, Hercules, California, USA). Reverse transcription was performed in a mixture containing 4 µL Reverse Transcriptase, 10 µL 100 ng RNA and 6 µL ultrapure water, under the following conditions: 5 min at 25°C, 20 min at 46°C and 1 min at 95°C. Freshly synthesised cDNAs were diluted by half and stored at -20°C.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed with a pair of primers targeting *Cyp51A* and also with two pairs of primers targeting the GAPDH and actin housekeeping genes (Annexe 1 Table S1). Reactions were carried out in a final volume of 10 µL: 5 µL of SYBR Green (iQ⁺ Universal SYBR Green supermix; Biorad Laboratories, Hercules, California, USA), 1 µL of 5 µM primers, 2 µL of ultrapure water and 2 µL of cDNA. Amplifications were monitored using the Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories Inc.) with the following thermal profile: 3 min at 95°C, (15 sec at 95°C, 30 sec at 60°C) x 39 cycle, 30 sec at 65°C, and 30 sec at 95°C for amplicon dissociation curves.

A primer validation experiment was carried out beforehand. To determine the relative expression of *Cyp51A*, the comparative threshold cycle (Ct) method (Schmittgen and Livak, 2008) was used using formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The control sample was the sensitive strain S755 in the absence of fungicide to determine expression. Three biological replicates with three technical replicates per biological replicate were performed for each modality.

3.3.9. Lipid extraction and analysis

Sterols were identified and quantified from 50 mg of freeze-dried mycelium. Direct saponification was carried out with the addition of an internal standard (cholesterol) and 3 mL of methanolic potash (KOH; dissolved in methanol at a concentration of 6%). Cholesterol (1mg/mL) diluted in hexane was added to obtain an amount of 30 µg in one sample. Cholesterol was chosen because it is a sterol different from ergosterol. The whole was placed on a heating block for 2 hours at 70°C with the cap closed and three pumice stones present. The sterols were then extracted by adding 5 mL of hexane and 1 mL of water, then homogenised using a vortex. The upper phase was recovered and placed in another tube. The addition of hexane, homogenisation and recovery of the upper phase were repeated twice. The upper phase was concentrated under vacuum in a centrifugal evaporator, the sterols were extracted into 2 mL of hexane and placed in a flask, then concentrated in a centrifugal evaporator. The sterols were recovered in 200 µL of hexane. The sterols were analysed using a Shimadzu QP-2010 Ultra gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) (Shimadzu, Japan) equipped with a single quadrupole mass detector and simultaneously coupled to a flame ionisation detector (FID). Samples were analysed in fractionated mode (80:1 ratio) on a ZB-5MS fast capillary column (10 m length x 0.1 mm internal diameter x 0.1 µm phase thickness, 5% phenyl-arylene / 95% dimethylpolysiloxane, Zebron, Phenomenex, Torrance Calif, U.S.A.) using helium as the carrier gas at a constant linear velocity (50 cm/sec). The injector temperature was 280°C and the detector temperature was 380°C and 280°C for the FID and ion source, respectively. The temperature programme started with an initial temperature of 130°C and increased by 50°C every minute to reach a final temperature of 330°C, which was maintained for 2 minutes (Figure article 2-4). The ionisation mode was electron impact at 70 eV and the mass range between 50.0 and 600.0 u was scanned. SIM (single impact monitoring) mode was used simultaneously. Sterol quantification was performed using cholesterol (Sigma-Aldrich) as an internal standard. Sterols were identified by comparing their relative retention times (Tableau 3-1, partie 4.3) with those of commercial sterol standards (Sigma-Aldrich) and by comparing them with spectra obtained from commercial standards and/or published in the literature (NIST standard reference database). Three biological replicates with five technical replicates per biological replicate were carried out for each modality.

Phospholipids were extracted and analysed by Lipometrix (Leuven, Belgium) (Talebi *et al.*, 2023). These analyses were carried out using approximately 10 mg of freeze-dried mycelium from two different strains of *V. inaequalis*. Briefly, the *V. inaequalis* pellets were homogenised in water, then the lipids and internal standard were extracted with 1 N HCl:CH₃OH 1:8 (v/v), CHCl₃ and 200 µg/mL antioxidants. The organic phase was recovered and evaporated. The pellet was solubilised in ethanol and analysed by liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionisation. The negative ionisation mode using fatty acid fragment ions was used to measure phospholipids. Peaks were integrated using MultiQuant

softwareTM. Isotopic contributions were used to correct lipid species signals. Finally, quantification was carried out in accordance with Lipidomics Standard Initiative (LSI) guidelines. Three biological replicates were performed for each modality.

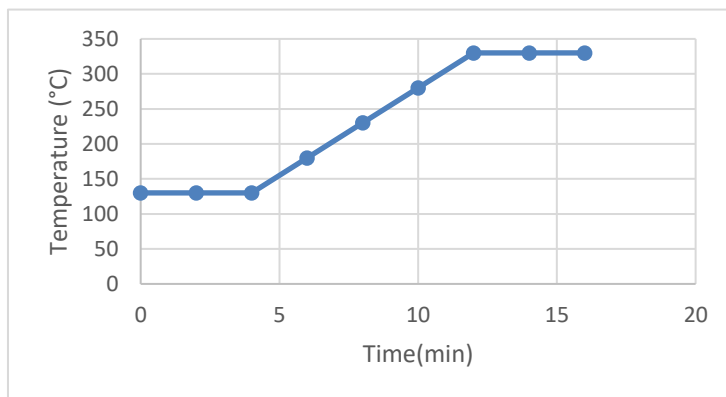


Figure article 2-4 : Temperature program for sterol GC-MS analysis.

3.3.10. Statistical analysis

A half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated from the dose-response curve obtained for each lipopeptide or fungicide and for each fungal strain, using non-linear regression completed in XLSTAT software (Lumivero, France). The comparison of IC_{50} values between molecules and strains was carried out using a two-factor ANOVA followed by a Tukey test with a global α risk of 5%, using XLSTAT software (factors were strains and antifungal molecules). For the gene expression assay, statistical analyses were performed on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values using a one-way ANOVA followed by a Tukey test with a global α risk of 5%, using XLSTAT software. The relative composition of sterols and phospholipids was analysed. All compounds representing less than 1% were excluded from the statistical analysis. The conditions of use (normality and homoscedasticity) were checked and validated. Based on the relative compositions, a one-factor ANOVA followed by a Tukey test was performed to determine whether there was a significant difference between the two strains. The p-values were compared with an adjusted α -risk (Bonferroni adjustment) by dividing the global α -risk of 0.05 by the maximum number of molecules tested ($0.05/7=0.007$ for seven molecules, for example).

3.4. The results

3.4.1. Lipopeptide characterization using RP-HPLC-MS

The lipopeptides used in the present study were first characterized with RP-HPLC-MS (Annexe 1 Figure S2A-E). Analysis of lichenysin revealed the presence of four major isoforms with a C13 to C15 fatty acid chain, the amino acid in position 7 being

either Valine or Leucine (m/z $[M+Na^+]$ 1030, 1029, 1044, respectively). Analysis of pumilacidin showed the presence of six major isoforms with a fatty acid chain from C15 to C17 but also changes in position 7 of the peptidic chain, which can be either a leucine or a valine (m/z $[M+Na^+]$ 1059, 1073, 1087 and 1101, respectively). Analysis of iturin A reveals the occurrence of three major isoforms displaying a fatty acid chain from C14 to C16 (m/z $[M+Na^+]$ 1065, 1079 and 1093, respectively). Analysis of mycosubtilin solution highlighted the presence of five major isoforms containing a fatty chain from C14 to C18 (m/z $[M+H]^+$ 1043, 1057, 1071 and 1099, respectively). Finally, the analysis of fengycin (plipastatin) showed the presence of 9 major isoforms of plipastatin A or plipastatin B containing a fatty chain from C15 to C19 (m/z $[M+H+H]^+$ 725, 732, 739, 746, 731, 753, 738, 760 and 745, respectively).

3.4.2. The Rs552 strain showed reduced sensitivity to azoles and fengycin, but not to other lipopeptides.

The antifungal activity of five lipopeptides (alone or in a binary mixture) and two azole active substances was evaluated against the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552 (Figure article 2-5A; Annexe 1 Table S2). As expected, the two strains showed distinct levels of sensitivity to tebuconazole (IC_{50} values of 0.012 and 1.153 mg/L for S755 and Rs552, respectively), confirming previous results (Desmyttere *et al.*, 2019). The two strains also showed distinct levels of sensitivity to tetraconazole (IC_{50} values of 0.009 and 0.907 mg/L for S755 and Rs552, respectively). The IC_{50} values and the sensitivity patterns of both strains S755 and Rs552 to tebuconazole are close those highlighted in a preliminary experiment on solid medium for two reference *V. inaequalis* field strains (NRRL 66904, baseline sensitive isolate and NRRL 66905, a DMI resistant isolate) previously assessed by Lichtner *et al* (2020), with a resistant factor (ratio IC_{50} of resistant *versus* IC_{50} of sensitive) of 61 for both couples of strains S755-Rs552 and NRRL 66904-NRRL 66905 (*data not shown*).

With an IC_{50} value of 0.024 mg/L for S755, fengycin showed strong activity, close to that of tebuconazole. It is interesting to note that fengycin showed an IC_{50} value greater than 42 mg/L for Rs552. Mycosubtilin was the second most active lipopeptide, while iturin A was the third. These two compounds from the iturin family showed the same level of activity on both strains, with mycosubtilin being more active than iturin A. Lichenysin and pumilacidin from the surfactin family showed an IC_{50} value greater than 42 mg/L on both strains.

For the FI binary mixture, the activity was higher for strain S755 than for strain Rs552. For strain S755, the activity was intermediate between that of fengycin alone and that of iturin alone. For strain Rs552, the activity was equal to that of iturin alone and identical to that of the azoles. For the FL and FP binary mixtures, the activities were also higher for strain S755 than for strain Rs552. For strain S755, the activity was similar to that of fengycin alone. Surprisingly, activities were calculated for Rs552, while fengycin, pumilacidin and lichenysin alone had no activity.

Analysis of the chemical structure of lipopeptides has shown that they are made up of a peptide part and a fatty acid chain of variable nature. Fengycin is the only decapeptide tested, while the other lipopeptides are heptapeptides. Similarly, the length of the fatty acid chains varies from C12 to C17 depending on the lipopeptides tested and there are several possible isoforms per lipopeptide (Figure article 2-5B). Although the activities of the heptapeptides are identical in the 2 strains, they are very different in structure. Iturin A showed good activity but was statistically weaker than mycosubtilin. We found that iturin A differed from mycosubtilin only by the inversion of Ser and Asn in positions 6 and 7 of the peptide part and by a shorter fatty acid chain. Similarly, pumilacidin and lichenysin do not have the same amino acid nature and fatty acid chain length as iturin A and mycosubtilin.

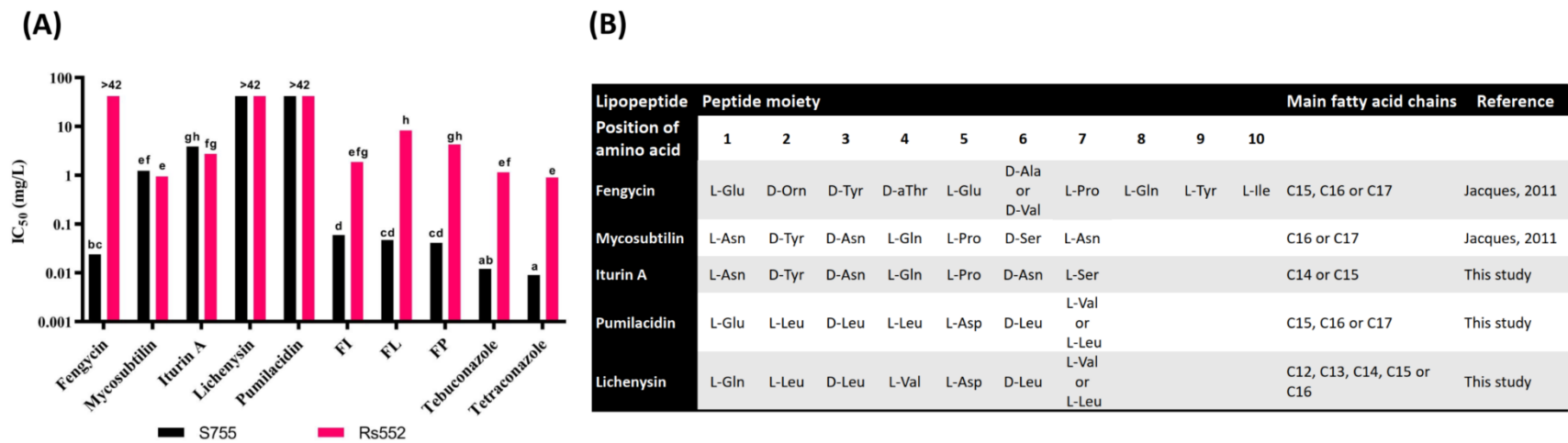


Figure article 2-5 : Lipopeptide analysis and antifungal activity against the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Antifungal activity of five lipopeptides (fengycin, mycosubtilin, iturin A, surfactin, lichenysin, pumilacidin), four binary mixtures of them (fengycin-iturin A, fengycin-lichenysin, fengycin- pumilacidin), and two azole fungicides (tebuconazole and tetraconazole) against S755 and Rs552. Bars with different letters indicates a significant difference according to ANOVA two factor -Tukey test at $P=0.05$. **B**, Molecular structures of the assessed lipopeptides, with a description of the peptide moiety and the fatty acid chain.

3.4.3. Fengycin induces morphological and cytological changes

Light microscopic observations were performed to determine whether morphological changes in the mycelium of the two strains of *V. inaequalis* occur in the presence of fengycin. In the control condition, the mycelium was well developed with long and regular hyphae (Annexe 1 Fig. S3A, B). Vesicle-like structures, which formed a sac that could be slightly swollen or cracked, were observed in both strains in the presence of fengycin (Annexe 1 Fig. S3C, D, E, F), hence agreeing previous results (Desmyttere *et al.*, 2019). These vesicle-like structures were observed in relation to the concentration and with a greater presence in strain S755 compared to strain Rs552 (*data not shown*). To investigate these changes further, TEM observations were made on the mycelium of both strains grown in the presence of fengycin and compared with untreated fungal mycelium. Under control conditions, the cell walls and plasma membrane were uniform and intact (Figure article 2-6A, B). In the presence of fengycin, the plasma membrane became incomplete, and the cytoplasmic content was reduced, becoming more transparent and less abundant, or even partially lost (Figure article 2-6C, D). Vesicle-like structures appeared to be formed by an empty space between two cell walls (Figure article 2-6E, F). These observations point to a mode of action involving modifications of the fungal cell wall, plasma membrane and cytoplasm compromising cellular integrity, with, it would seem, a lower abundance of vesicles in Rs552 compared to S755.

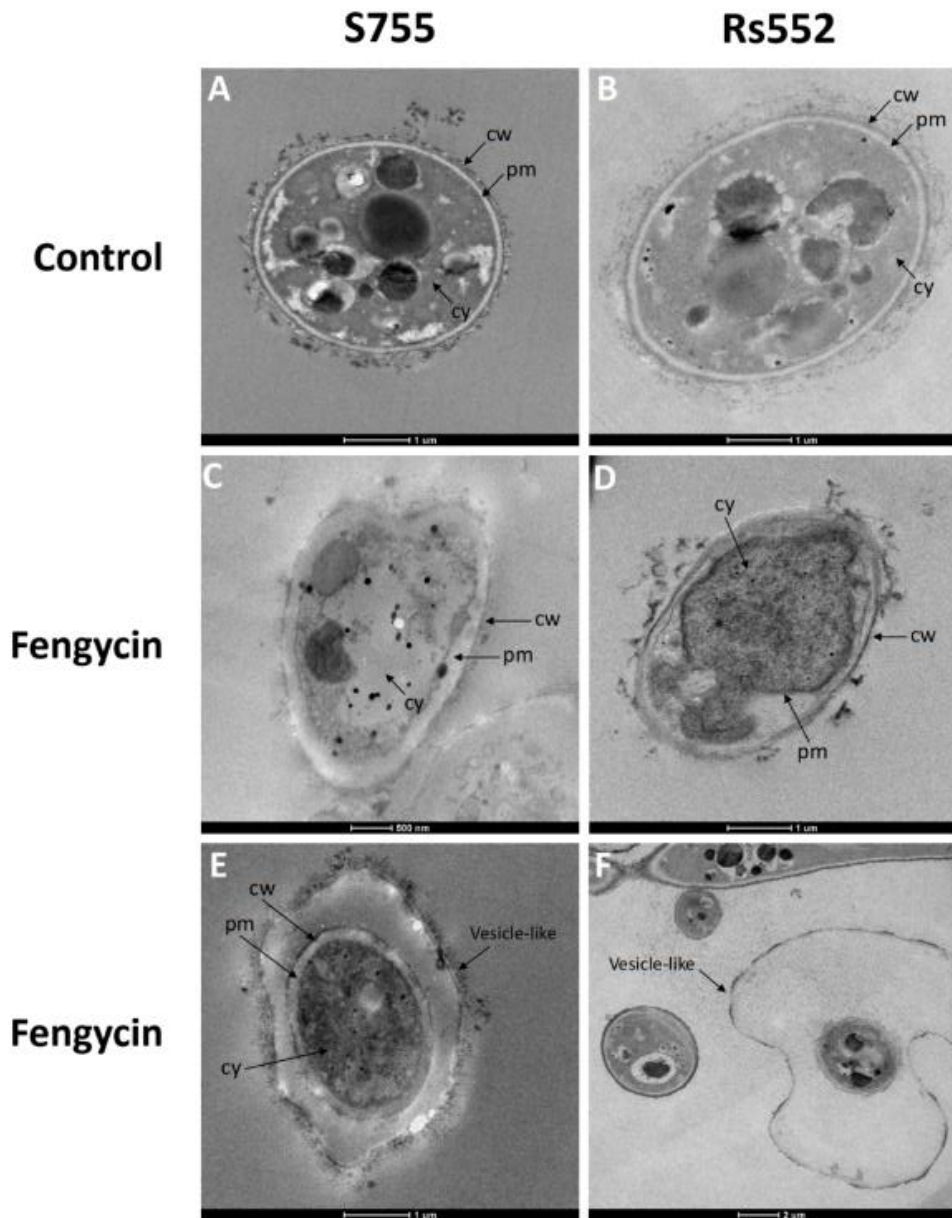


Figure article 2-6 : Observations of the mycelium of both *V. inaequalis* strains S755 and Rs552 using photonic (A-F) and transmission electron microscopy (G-L). **A**, S755 control; **B**, Rs552 control; **C**, S755 at 0.66 mg/L fengycin; **D**, Rs552 at 0.66 mg/L fengycin; **E**, S755 at 0.66 mg/L fengycin; **F**, Rs552 at 42 mg/L fengycin. cw, cell wall; pm, plasma membrane; cy, cytoplasm.

3.4.4. S183C substitution in *CYP51A* with no effect on azole affinity

In order to identify the mechanisms responsible for the difference in sensitivity to tebuconazole, the *Cyp51A* gene (encoding the CYP51A enzyme, the target of azoles) of the two *V. inaequalis* strains S755 (ACC#OR909969) and Rs552 (ACC#OR909970) was sequenced in its entirety (1674 bp). Comparison of the sequences obtained from S755 and Rs552 with those of the *Cyp51A* gene from two strains in the literature (Ent27 and Ent54, respectively sensitive and resistant to myclobutanil (Schnabel and Jones, 2001) revealed a non-silent mutation in sensitive strain S755 at position 710 bp (Figure article 2-7A). Strain S755 had a thymine, while Ent54, Ent27 and Rs552 had an adenine. This mutation resulted in a change in amino acid sequence, corresponding to the substitution of a serine for a cysteine at position 183 (S183C) in strain S755 (Figure article 2-7B). Serine and cysteine are uncharged polar amino acids, but cysteine is a sulphur amino acid that can form disulfide bridges in the corresponding protein.

Given that such an amino acid substitution could affect the affinity of azoles with the CYP51A enzyme, docking and dynamics analyses were carried out *in silico* to test this hypothesis. The docking of a series of several azoles (difenoconazole, epoxiconazole, metconazole, prothioconazole, tebuconazole and prochloraz) and the molecular dynamics of *CYP51A* of the two strains Rs552 and S755 and that of strain Ent54 taken from the literature (Schnabel and Jones, 2001) were carried out. The four structures found in the PDB database with the best sequence identity were 4lxj (*S. cerevisiae* CYP51 bound to lanosterol), 5eac (*S. cerevisiae* CYP51 bound to R-tebuconazole), 5eah (*S. cerevisiae* CYP51 bound to difenoconazole), and 4wmz (*S. cerevisiae* CYP51 bound to fluconazole). All these models had a resolution of between 2.54 and 1.96 Å. As we were interested in the binding mode of tebuconazole, we selected 5eac as the crystallographic reference to construct a 3D model of CYP51A from *V. inaequalis* (Figure article 2-7C). Sequence identity is 47.5%, which is high enough to produce a plausible model. In addition, alignment showed that the residues involved in heme group binding are conserved. There is no peptide torsion outside a 15° window around the anti-planarity and no inverted chirality. The Ramachandran plot showed that four residues (0.9%) were in the unauthorised region.

The CYP51A sequences of S755 and Rs552 were constructed by mutating the residue corresponding to position 183 (Figure article 2-7D). As expected from the position of S/C183, no clear differences were found between Rs552 and S755 when docking difenoconazole, epoxiconazole, metconazole, prothioconazole, tebuconazole and prochloraz. All of them were placed close to the heme. Prothioconazole was the least effective. Its dihydrothiazole-3-thion pointed away from the heme in just under 2/3 and 1/3 of the exposures for Rs552 and S755, respectively. Difenoconazole and tebuconazole obtained the best results, with almost all of the 30 poses being superimposable on the crystallographic structure of tebuconazole.

(A)

```

Ent27 ..... CCAACGCTACCTCAATTCAAAGCGAAAAGGGCAGCTTCGATGTTGCGCTCCATG.....
Ent54 ..... CCAACGCTACCTCAATTCAAAGCGAAAAGGGCAGCTTCGATGTTGCGCTCCATG.....
Rs552 ..... CCAACGCTACCTCAATTCAAAGCGAAAAGGGCAGCTTCGATGTTGCGCTCCATG.....
S755 ..... CCAACGCTACCTCAATTCAAAGCGAAAAGGGCAGCTTCGATGTTGCGCTCCATG.....
    
```

(B)

```

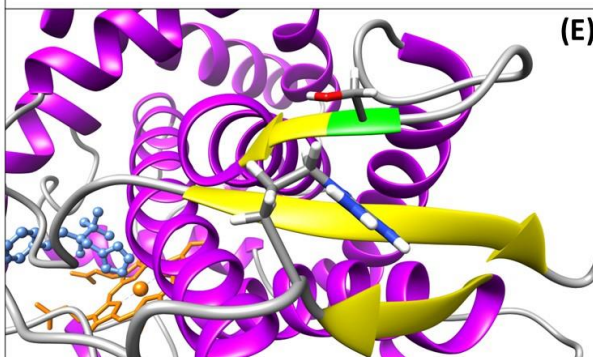
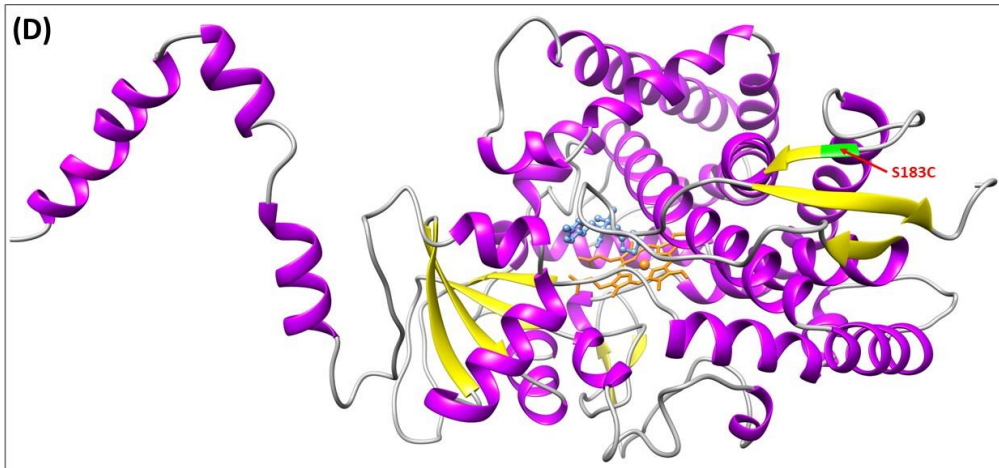
Ent27 ..... SYVTLIQEQVEDYTKRYPQKGEKGSFDVCASMAEITFTASRLQKEVRDKFDASFADLFH.....
Ent54 ..... SYVTLIQEQVEDYTKRYPQKGEKGSFDVCASMAEITFTASRLQKEVRDKFDASFADLFH.....
Rs552 ..... SYVTLIQEQVEDYTKRYPQKGEKGSFDVCASMAEITFTASRLQKEVRDKFDASFADLFH.....
S755 ..... SYVTLIQEQVEDYTKRYPQKGEKGSFDVCASMAEITFTASRLQKEVRDKFDASFADLFH.....
    
```

(C)

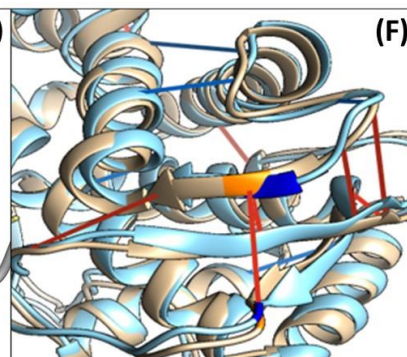
```

Saec      - SIVGEAL EYVNIQLSHFLALPLAQRISLI IIPFIYNI VWOLLYSLRKDRFLFVYNI FVVGSAVVYGMKPYEFEEQOKKYGGI FSVLLGRVMTVYLGPKGHEFVFNA 110
Ent54     - MGLLSPLASLPGSDRSWLFYTLASFGFTVAIV--AANLKKQLLPN-PNEERVVFHWFEEFFNTVYVGIDRIKFAEGKEKGGDIETELILGRKTVMYISGKQNEIILNG 109
Saec      - LADVSAAEAAAHLLTPVFGKCVIYDCPNRLMEQKKFVKGALTKAFAKSYVPLIAEEVYKFRDSKNFRLNERTTGTIDVMVTQPEMTIFATSRLLGKEMRAKLDTFDA 221
Ent54     - QSHVNAAEELISPLTPVFGSDVYDCPNKLMQKKFVKYGLTTEALKSYVTLIQOEVEDYTKRYPQKGEK--EK--GSFDFVCASMAEITFTASRLQKEVRDKFDASFADLFH 216
Saec      - YLYSDLDKGGTFINVFNLPLNENYKRDHAKAI SGTYSMLKERRKNNDIQDR-DLDSLMKNSTYKDSVKMTDQETANLLGVLMGGQHTSAATSAWILLHLAERPDV 331
Ent54     - DLFHDLDMGFSFINELMWALPHNRRRDAANKMTETYLEIQSRKAEQVKKSEDMWNLMO-CVYKNGTIPDKELAHMMALLMAQGHSSSSTSSWILLRLATRPDI 326
Saec      - QGELYEQMRVLDGQKKETIQLQGFPLNGITKETLRMHHLHSLFKKVMKDHVPNHSVIFAGYHYVVSFGYTHLRDEYFFNAHQFNIHRWNDS-ASSSYVQ----- 437
Ent54     - REELMQEIRNCGADLPPLQEDLARMLPHNGIKETLRMHHSLSILAKKQPMVEGPEPTPTSHVLLAALIASGSSPMYFAPEKWEPRHDEQGGGTNIQDENGG 437
Saec      - EEVDYGFSAISKGVSPPYLPFGGRRRCIGEFAYCOLGVLMISIFITLKWHPYEGKTVPPDFTSMVTLFTGAKIWEKRNPEKIGGRHH 530
Ent54     - EEKEDYGLTKGASPPYLPFGGRRRCIGEFAYMDLNTVLATQVREFKFLRDEGSEFKTDFSLFSGLRLPAWLNWERREKSS----- 524
    
```

(D)



(E)



(F)

Figure article 2-7 : Structural and *in silico* functional analysis of CYP51A in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Alignment of the obtained *Cyp51A* nucleotide sequences. Ent27, myclobutanil sensitive strain (AAC#AF227920) (Schnabel and Jones, 2001); Ent54, myclobutanil resistant strain (ACC# AF262756) (Schnabel and Jones, 2001); Rs552, azole reduced sensitivity strain (ACC#OR909970); S755: azole sensitive strain (ACC#OR909969). **B**, Alignment of the obtained *Cyp51A* amino-acid sequences. **C**, Sequence alignment of *Seac* (*S. cerevisiae* CYP51 enzyme) and *Ent54* (*V. inaequalis* CYP51 enzyme from the strain Ent54). Residues involved in the heme binding are encased in red. **D**, Model of CYP51A in *V. inaequalis*, with position of the CYP51A S183C substitution (in green). The helices are depicted in magenta, β sheets in yellow, the heme in orange, and tebuconazole in blue. **E**, Position of Ser 183 and Cys 492 in CYP51A. **F**, Differences of interaction between the serine bearing Rs552 (red) and the cysteine bearing S755 (blue). The interactions shown are present 80% or more of the simulation time.

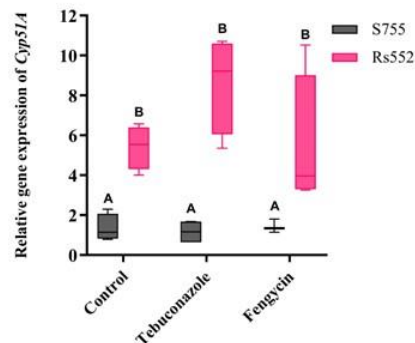
A molecular dynamics study was carried out to investigate the effect of the S183C substitution in strain S755. Interestingly, Arg 492 was spatially close to 183. Positioned at the beginning of the $\beta 3$ leaflet, residue 183 was followed by a loop forming a channel at the entrance to the catalytic pocket (Figure article 2-7E). Therefore, any change in its interaction network could have affected the stiffness or position of the loop at the entrance, which would have had a significant impact on the enzyme cycle. Four independent 100ns dynamics were run for Rs552 and S755 CYP51A, combining the results to obtain a wider range of conformations. The interactions of residue 183 were then studied with SINAPs (Figure article 2-7F). Although there were no observable differences in conformation or loop plasticity, Ser 183 was consistently engaged in hydrogen bonding with Arg 492, accounting for 80% of the simulation time, whereas Cys 183 was notably devoid of such bonding. Overall, the substitution detected in the CYP51A S755 enzyme had no potential effect on its structure and probably on its activity.

3.4.5. Rs552 constitutively displays an increased the *Cyp51A* gene expression, probably due to variations in the promoter region and the sequence of the transcription factor

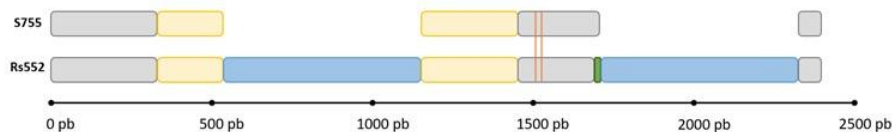
The Rs552 strain constitutively expressed the *Cyp51A* gene 4.9 times more than the sensitive strain (Figure article 2-8A). Furthermore, no significant induction of the *Cyp51A* gene was observed in each strain in the presence of tebuconazole or fenpyrthion compared with the control. These results indicate that the increased expression of *Cyp51A* is not induced by either tebuconazole or fenpyrthion, but that the gene is constitutively more expressed in the Rs552 strain. In order to identify the potential causes of this constitutive increased expression in Rs552, additional analyses were carried out by characterising the putative promoter region of the *Cyp51A* gene in both strains, using PCR amplification and Sanger sequencing. The promoter sequences of the *Cyp51A* gene were compared between the two strains (Figure article 2-8B) as well as with strain 3a-27-10, which is sensitive to myclobutanil and difenoconazole (Villani *et al.*, 2016). This comparison revealed marked variations in the region

upstream of *Cyp51A*. For both strains Rs552 and S755, a 499 bp insertion was observed (in yellow) relative to 3a-27-10. For strain Rs552, in addition to the 499 bp insertion, a second 613 bp insertion (in blue) was detected twice. The first 613 bp insertion is located within the 499 bp insertion. An 18 bp deletion was also observed in Rs552 (green). In addition, two deletions were observed at positions 385 and 402 in both Rs552 and S755 compared with strain 3a-27-10 (Villani *et al.*, 2016). The sequences of the 613 bp insertions (in blue) are identical. Our results are in agreement with previous work indicating that the *V. inaequalis* genome has a higher repetitive content than that of other fungal species, with repetitive regions occupying up to 47% of their genome sequence (Khajuria *et al.*, 2022).

(A)



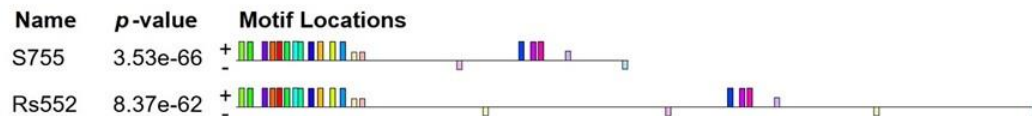
(B)



(C)

Motif	Symbol	Motif Consensus
1.		CCTCTGCGGGGAGGG
2.		GCTGCTGCGAGGGG
3.		TGCGGCGAGCAG
4.		GCGGAGAACAGGGG
5.		GGGTTGTGCGACGG
6.		TCCCAAGATGCGGC
7.		TACCTAGCCGCTC
8.		GCCGTTTCCACGGT
9.		GGACTTGGACCATGC
10.		AGGAGGGGATGACTC
11.		GGATATGTCGTGAG
12.		GAAGGCTGTGAGTG
13.		TTGCTAGAGAGAGG
14.		TTGGTCATGACTCTG
15.		CCCTGAATTTGAGAG

(D)



(E)

Protein	Function	Binding motif	Reference
SrbA	Transcription factor	A/T TCAC C/A CCA T/C	Blosser <i>et al.</i> , 2012
SrbA	Transcription factor	A/G TCA T/C/G C/G CCACT/C	Chung <i>et al.</i> , 2014
Sre	Transcription factor	A/G C/T C A/G/T NN C/T C/T/G A C/T	Todd <i>et al.</i> , 2006
SrbA	Transcription factor	ATCNNNNAT	Linde <i>et al.</i> , 2012
AtrR	Transcription factor	CGG-Nx-CCG	Hagiwara <i>et al.</i> , 2017; Yap <i>et al.</i> , 2023

(F)

Binding motif	Position in S755	Position in Rs552
ATCCCAAGAT	-1010	-2217
ATCCCTGAAT	-288	-882
ATCGGTTTCAT	X	-1720 and -723
CGGCAATTCCCGTGCAACCCG	-511	-1105
CGGTGGCTCCGCCACCG	X	-1615 and -428

Figure article 2-8 : Expression of the *Cyp51A* gene and sequence analysis of the *Cyp51A* upstream region (putative promoter) in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Relative *Cyp51A* expression in S755 and Rs552 in presence or absence of tebuconazole or fengycin. The presence of different letters in each molecule indicates a significant difference among the two strains according to the ANOVA-Tukey test at $P=0.05$. **B**, Simplified scheme of the *Cyp51A* upstream region alignment. Grey, conserved sequence; yellow, 499 bp insertion cut in two segments by 613 bp insertion; blue, 613 bp insertion; green, deleted sequence; orange, single nucleotide polymorphism. **C**, DNA-binding motif for transcription factors from MEME Suite (Bailey and Elkan, 1994). **D**, Position of DNA-binding motifs in the *Cyp51A* upstream region of S755 and Rs552. **E**, DNA-binding motifs obtained by MEME suite. **F**, DNA-binding motif positioning obtained by MEME suite in S755 and Rs552.

In addition, an analysis of putative *Cyp51A* transcription factor binding motifs was performed using Illumina whole genome sequencing of both strains. Using MEME and MAST software, a total of 15 motifs were found (Figure article 2-8C, D). GOMo analysis was used to identify the putative biological functions of these motifs. Motif 3 showed 83% specificity for binding to a transcription factor (ACC#GO:0003700). Among the transcription factors found, a sterol regulatory protein (UPC2) was detected. This protein is a transcription factor that binds sterol regulatory elements in *S. cerevisiae* with a CGG-Nx-CCG type binding site (Marmorstein *et al.*, 1992). In addition to the analysis of the MEME suite, a literature review was used to select five motifs to identify DNA-binding transcription factors (Figure article 2-8E). Of the five motifs found, only two were found to correspond to both the Rs552 and S755 strains: ATCNNNNAT and CGG-Nx-CCG (Figure article 2-8F). The ATCNNNNAT motif was found twice in strain S755 and four times in the region upstream of the *Cyp51A* gene. In Rs552, one motif was repeated twice (ATCGGTTTCAT), in the 613 bp insertion repeat. The other two motifs (ATCCCAAGAT and ATCCCTGAAT) were found in both strains. The CGG-Nx-CCG motif was found once in S755 and three times in Rs552. The motif common to both strains is CGG-N16(6)-CCG. The second motif in Rs552 was also repeated, as it was also found in the 613 bp CGG-N11(5)-CCG insertion. The motifs found may explain the increased expression of *Cyp51A* in Rs552, as this strain would have more DNA binding sites than S755.

3.4.6. Rs552 has increased membrane efflux pump activity compared to S755

The potential involvement of efflux pumps as a mechanism of reduced sensitivity to azoles and fengycin was examined phenotypically and genetically in both strains of *V. inaequalis*. Tolnaftate is an antifungal agent used to treat dermatophytic fungi and is also an indicator of multidrug resistance (MDR) in plant pathogenic fungi overexpressing efflux pumps (Leroux and Walker, 2010; Omrane *et al.*, 2015). Interestingly, tolnaftate significantly inhibited the growth of the sensitive strain S755 at different concentrations (IC_{50} value of 0.66 mg/L), whereas no inhibitory activity was observed on the strain Rs552 (*data not shown*). These results indicate a potential involvement of efflux pumps in the reduced sensitivity of Rs552 to tebuconazole.

(A)

		Efflux pump modulator						
(a)			Amitriptyline		Chlorpromazine		Verapamil	
	Strain	Concentration (mg/L)	4.5	7	4.5	7	4.5	7
Tebuconazole	S755	0.008	1.1	1.6	2.5	2.6	1.1	1.0
		0.012	0.9	2.5	2.9	3.1	1.2	0.9
		0.017	1.4	2.9	4.0	4.8	1.1	1.0
	Rs552	0.8	1.1	1.6	4.1	7.7	0.9	0.8
		1.2	1.1	1.6	4.5	6.5	0.9	0.7
		1.7	1.2	1.6	3.6	2.7	0.9	0.8
(b)			Amitriptyline		Chlorpromazine		Verapamil	
	Strain	Concentration (mg/L)	4.5	7	4.5	7	4.5	7
Fengycin	S755	0.01	0.9	0.9	0.9	0.7	0.9	1.0
		0.02	0.9	0.8	0.8	0.6	0.9	1.0
		0.04	0.6	0.6	0.5	0.3	0.6	0.8
	Rs552	1	0.8	0.8	0.8	0.7	0.9	1.0
		2	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	1.0
		4	0.8	0.6	0.6	0.5	0.9	0.9
(c)			Amitriptyline		Chlorpromazine		Verapamil	
	Strain	Concentration (mg/L)	4.5	7	4.5	7	4.5	7
Tolnaftate	S755	0.125	1.0	1.0	1.1	1.2	1.0	1.0
		0.25	1.0	1.1	1.1	1.7	1.3	1.2
		0.5	1.1	1.7	1.7	3.3	1.1	1.0
	Rs552	1.25	0.8	0.8	1.5	2.8	0.8	0.9
		2.5	0.9	0.9	1.9	2.8	0.9	1.0
		5	0.9	1.0	3.1	10.1	0.9	0.9

(B)

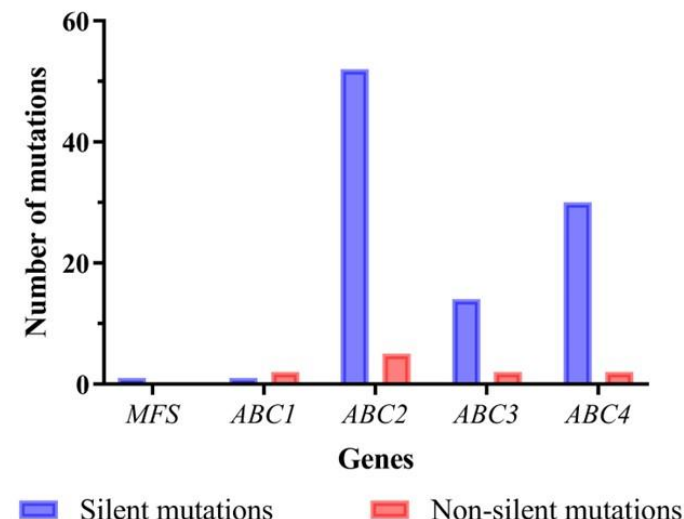


Figure article 2-9 : Biochemical and genetic analysis of efflux pumps in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Interaction ratios (IRs) between efflux pump modulators (amitriptyline, chlorpromazine, verapamil) and tebuconazole (a), fengycin (b), and tolnaftate (c). The used concentrations of fungicides are close to the IC₅₀ value obtained for each strain. Synergy is indicated by bold IR values. The interaction between fungicides and EPMs was considered additive when $0.5 < IR < 1.5$, synergistic when $IR \geq 1.5$, or antagonistic when $IR \leq 0.5$ (Leroux and Walker, 2013). **B**, Number of silent and non-silent mutations found in the ABC- and MFS-encoding genes in S755 and Rs552.

Efflux pump modulators (EPMs) were tested with tebuconazole, fengycin and tolinaftate to determine whether these pumps contribute to the mechanisms involved in the reduced sensitivity of Rs552. Firstly, the interaction of EPMs with tebuconazole was evaluated. At concentrations close to the IC_{50} value of each strain, synergy was observed with amitriptyline and chlorpromazine, but not with verapamil (Figure article 2-9Aa). Chlorpromazine was synergistic with tebuconazole at both concentrations tested, 4.5 and 7 mg/L, whereas amitriptyline was only slightly synergistic at 7 mg/L. At 7 mg/L, the interaction ratios (IRs) for chlorpromazine appeared higher than for amitriptyline, with IRs between 1.6 and 2.9 for amitriptyline and between 2.6 and 7.7 for chlorpromazine. In addition, higher IRs were also calculated with chlorpromazine at 7 mg/L for Rs552 (2.7 to 7.7) compared with S755 (2.6 to 4.8). For the other concentrations, the interactions between EPMs and tebuconazole were only additive (Annexe 1 Table S3a). Between 0.8 and 1.7 mg/L tebuconazole, S755 was completely inhibited, whereas no inhibition was observed for Rs552 at concentrations between 0.008 and 0.17 mg/L (data not shown). In contrast to the synergies obtained with tebuconazole, no synergistic interaction occurred between fengycin and the EPMs tested at concentrations close to the IC_{50} for S755 or higher for Rs552 (Figure article 2-9Ab). The interactions were mostly additive and even slightly antagonistic, even at the other concentrations tested (Annexe 1 Table S3b). EPMs were also combined with tolinaftate. Synergy was mainly observed with chlorpromazine, particularly on Rs552, with a high IR of 10 calculated between chlorpromazine at 7 mg/L and tolinaftate at 5 mg/L (Figure article 2-9Ac). Synergy was also observed for S755 with amitriptyline 7 mg/L. The combination of verapamil and tolinaftate was not synergistic on both strains. The IR of tolinaftate was mainly additive at other concentrations (Annexe 1 Table S3c). On the basis of these results, efflux pumps appear to be involved in the reduced sensitivity of Rs552 to azoles.

From the whole genome sequences of both strains, four *ABC* pump genes and one *MFS* pump gene were found (Figure article 2-9B). For the *MFS* pump gene, a single silent mutation was found in Rs552. However, for the *ABC* pump genes, an increased number of silent and non-silent mutations were detected in Rs552 (Figure article 2-9B; Annexe 1 Table S4). Non-silent mutations can influence the protein through amino acid changes such as in the *ABC1* (I1229M, V1299I), *ABC2* (D752N, K846R, V929I, S971P, N1436S), *ABC3* (A977S, S1051N) and *ABC4* (A757T, S816A) proteins. The I1229M substitution in the *ABC1* pump can modify the structure of the protein, as methionine is a sulphur amino acid that can form disulfide bridges.

In addition, variations in the respective putative promoter regions of the five efflux pump genes detected were analysed. No polymorphisms were observed for the *MFS* and *ABC2* genes. However, the putative promoter regions of the *ABC1* and *ABC4* genes showed several polymorphisms (Annexe 1 Table S4) which could affect gene expression. In addition, the CGG-Nx-CCG binding motif, found in *ABC* pumps, was detected in the *ABC1* and *ABC4* genes. The CGG-Nx-CCG motif was found three times in the promoter regions of both pumps in both strains. For *ABC1*, the CGG-N15-CCG,

CGG-N18-CCG, CGG-N22(18)-CCG motif was located at 675 th, 641st, and 428 th 5' bases in Rs552 and at 699 th, 665th, and 435 th 5' bases in S755. For *ABC4*, the CGG-N19-CCG, CGG-N13-CCG and CGG-N18-CCG motifs were located at 486 th, 364 th and 313 th 5' bases in S755, and at 489 th, 367 th and 316 th 5' bases in Rs552. These motifs located in the upstream regions would influence the level of expression of the genes encoding the targeted efflux pumps, which could explain the difference observed between the two strains in terms of their efflux pump activity.

3.4.7. Rs552 and S755 vary slightly in sterol and phospholipid composition

Sterols in the mycelium of the two strains of *V. inaequalis* were analysed and quantified by GC-MS/FID. Several sterols were identified, mainly ergosta-5,8-dien-3-ol, ergosta-7,22-dien-3-ol and ergosta-5,24-dien-3-ol in a lower percentage (Figure article 2-10A; Annexe 1 Table S5). These sterols are derivatives of ergosterol. Squalene, a sterol precursor in the sterol biosynthesis pathway, was also identified. Quantification of total sterols revealed that there was no quantitative difference between the two strains (6.20 ± 1.79 and 6.27 ± 1.66 μg sterols/mg dry weight for S755 and Rs552 respectively, *data not shown*), indicating that the strains produce the same total amount of total sterols. Qualitative analysis showed no significant difference between the different sterols, with the exception of ergosta-7,22-dien-3-ol, which was detected in a higher proportion in strain Rs552 ($21\% \pm 0.32$) compared with strain S755 ($16.3\% \pm 1.25$) (Figure article 2-10A; annexe 1 Table S5).

Phospholipid analysis was used to identify the different classes of phospholipids and their associated fatty acid chains in the two fungal strains. The relative composition of the phospholipid classes showed that both strains are composed of phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylserine (PS), lysophosphatidylethanolamine (LPE) and traces of phosphatidylglycerol (PG) (Figure article 2-10B). PI followed by PE and PC represented $46\% \pm 4.44$, $33\% \pm 3.09$ and $13\% \pm 2.3$ respectively for strain S755, and $46.7\% \pm 5.68$, $33\% \pm 4.5$ and $12\% \pm 2.28$ for strain Rs552 (Annexe 1 Table S5). There were no significant differences between the two strains for each phospholipid class (Figure article 2-10B). Quantification of total phospholipids revealed that there was no quantitative difference between the two strains (97.14 ± 7.84 and 102.64 ± 24.87 μg phospholipids/mg dry weight for S755 and Rs552 respectively, *data not shown*), indicating that the strains produced the same total amount of total phospholipids.

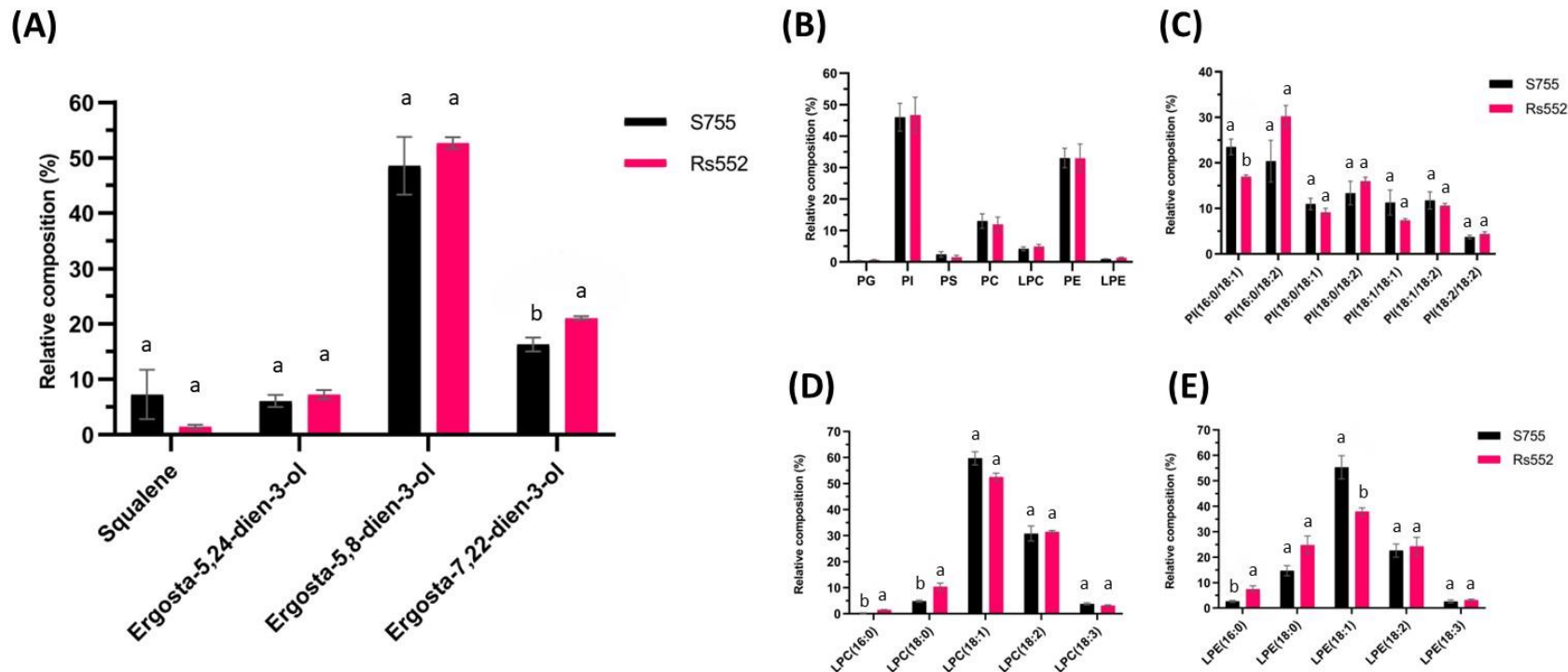


Figure article 2-10 : Comparison of the relative composition of both total sterols and total phospholipids in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, Relative composition (%) comparison of total sterol derivatives. **B**, Relative composition (%) comparison of different classes of phospholipids: phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylethanolamine (PE), and lysophosphatidylethanolamine (LPE); **C**, Comparison of the relative composition (%) of PI; **D**, Relative composition (%) comparison of LPC; **E**, Comparison of the relative composition (%) of LPE. Bars represent means and error bars standard deviation. The presence of letters indicates a significant difference among the two strains according to the ANOVA one factor – Tukey test (with a α adjusted to = 0.007); n=3.

Within each phospholipid class, the fatty acids were determined and analysed. Significant differences were obtained for the PI, LPC and LPE classes (Figure article 2-10C, D, E) while no difference was observed for the PE, PC, PS and PG classes (Annexe 1 Fig. S4). The main change was in PI(C16:0/C18:1), which was lower in proportion in Rs552 than in S755 (Figure article 2-10C; Annexe 1 Table S5). For LPC, the minor forms LPC(16:0) and LPC(18:0) were present in a higher proportion in Rs552 than in S755 (Figure article 2-10D). And for LPE, the major form LPE(18:1) was in lower proportion in Rs552 than in S755 while the minor form LPE(16:0) was in higher proportion (Figure article 2-10E).

Differences in the sterol and phospholipid compositions of the two strains were observed. Although these differences do not appear to be very significant, they could be linked to different membrane lipid compositions and a particular cellular function between the two strains.

3.5. Discussion

3.5.1. Antifungal activity against *V. inaequalis* varies according to lipopeptide family

Antifungal activity tests revealed variable activity profiles for the three lipopeptide families against the two *V. inaequalis* strains used, S755 and Rs552. The bioactivity of lipopeptides has been well studied against a wide range of phytopathogens, such as *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Botcazon *et al.*, 2022) and *Pyricularia grisea* (Zhang and Sun, 2018) for fengycin; *Zymoseptoria tritici* (Mejri *et al.*, 2018) for mycosubtilin, and *Phytophthora capsici*, *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia solani* for iturin A (Liu *et al.*, 2007). However, the antifungal activity of lichenysin and pumilacidin is poorly documented. Interestingly, we have revealed here that lichenysin and pumilacidin (belonging to the surfactin family) do not have antifungal activity against *V. inaequalis* as previously shown for surfactin (Desmyttere *et al.*, 2019) compared to mycosubtilin and iturin A (belonging to the iturin family). This family lipopeptide-dependent bioactivity is probably due to variations in the structure of the peptide part, which are stronger at the inter- than at the intra-family level (Figure article 2-5B). Within the same family, variations in the fatty acid chain can also modulate biological activity, as it was demonstrated with the activity of mycosubtilin against *Botrytis cinerea* (the longer the fatty acid chain, the better the activity) (Bechet *et al.*, 2013). This was confirmed in this work with the activity of mycosubtilin (with 16 and 17 carbon fatty acid chains predominating) being significantly higher against both strains of *V. inaequalis* compared to Iturin A (which is predominantly produced with C14 and C15 fatty acid chains).

Interestingly, fengycin exhibited the highest antifungal activity against S755 of all the lipopeptides evaluated, with a level similar to that conferred by the pure active substance, tebuconazole, but lower than that of tetraconazole. The IC₅₀ measured is one of the lowest cited in the literature for fengycin. This level of activity could be

due to a stronger interaction of this molecule with the components of the plasma membrane of sensitive strain S755. For the binary mixtures, all the mixtures with fengycin showed similar levels of activity on S755 to those of fengycin alone, suggesting that there is no enhancement of its activity by the other lipopeptides. As highlighted previously, fengycin showed no antifungal activity on Rs552 when tested alone (Desmyttere *et al.*, 2019), whereas fengycin-lichenysin and fengycin-pumilacidin mixtures showed a significant effect on this strain (Figure article 2-5A). Such 'mixture-induced' biological activity has already been demonstrated for the fengycin-surfactin mixture, suggesting a similar role for different members of the surfactin family in this effect. This could be due to a chemical interaction or to the formation of mixed micelles between the combined lipopeptides, which could result in a modification of their properties. Synergistic effects between other lipopeptide combinations have already been reported in several fungi (Maget-Dana *et al.*, 1992; Ongena *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2007; Desmyttere *et al.*, 2019).

3.5.2. Increased expression of *Cyp51A* and overactivity of the membrane efflux pump are probably the main mechanisms responsible for the reduced sensitivity to azoles in Rs552

Reduced sensitivity to azoles can be explained by three different mechanisms, including mutations in the *Cyp51A* gene, increased expression of this gene and/or increased activity of membrane efflux pumps. Surprisingly, we detected a S183C substitution in the *Cyp51A* gene of strain S755, while no change was found in the reduced-susceptibility strain Rs552. Other substitutions are known to reduce azole sensitivity in resistant strains of *V. inaequalis*, including Y133F (Yaegashi *et al.*, 2020) and M141T (Hoffmeister *et al.*, 2021). Nevertheless, the substitution found in S755 has never been reported. However, no structural modifications or changes in the opening of the catalytic pocket were detected, suggesting that the S183C substitution found in S755 would have no impact on sensitivity to azole fungicides. Quantification of expression showed that, unlike S755, Rs552 constitutively overexpressed the *Cyp51A* gene (Figure article 2-8A). Furthermore, *Cyp51A* expression was not induced by treatment with tebuconazole and fengycin in either strain. In previous work, resistance of *V. inaequalis* to difenoconazole and/or myclobutanil was associated with an increased expression of the *Cyp51A* gene (Schnabel and Jones, 2001; Villani *et al.*, 2016). Therefore, it is clearly established that the observed constitutive increased expression of *Cyp51A* may contribute to the reduced sensitivity to azoles in Rs552.

To better understand the increased expression of *Cyp51A* in strain Rs552 at the molecular level, a comparison of the putative promoter upstream of the *Cyp51A* gene in different strains with different sensitivities to tebuconazole was undertaken. A 499 bp insertion in both strains and two 613 bp insertions in strain Rs552 were identified in the *Cyp51A* promoter region. The 499 bp insertion has previously been observed in *V. inaequalis* strains susceptible and resistant to myclobutanil/difenoconazole, and therefore does not always appear to correlate with the resistance mechanism (Schnabel

and Jones, 2001; Villani *et al.*, 2016). However, Schnabel and Jones (2001) identified a 553 bp insertion in the promoter region of several resistant strains. This sequence, inserted at the same position of the 613 bp insertion, could act as a transcriptional enhancer of *Cyp51A* and was correlated with myclobutanil resistance in the Ent2 strain (ACC#AF227917). This 613 bp insertion in Rs552 could therefore contribute to the *Cyp51A* increased expression. These two reports conclude that these insertions may explain resistance in some strains, but not in all, suggesting the existence of another resistance mechanism.

In addition to this insertion analysis, a bioinformatic analysis of *Cyp51A* transcription factor binding sites was carried out. Transcription factors are protein-based molecules that play a crucial role in the regulation of gene expression. They are formed by at least two core structural domains: (i) an effector domain acting as a regulating part able to detect signals mediated by intracellular metabolites or by signals originating from the extracellular environment (leading to repression or activation of gene expression) and (ii) a DNA binding domain (usually including helix-turn-helix, helix-loop-helix, zinc finger or leucine zipper motifs) that specifically recognizes and binds to regulatory sequences (transcription factors binding sites) located in promoter regions of target genes (He *et al.*, 2023). Since transcription factors can control gene expression, an identification of the corresponding binding sites would provide a valuable knowledge. Two putative motifs have already been identified in *A. fumigatus*, corresponding to possible DNA binding sites for the *SrbA* and *AtrR* transcription factors. The *SrbA* protein is a basic helix-loop-helix transcription factor belonging to the sterol regulatory element binding protein family (Chung *et al.*, 2014) while the *AtrR* protein is a fungal specific Zn2-Cys6 transcription factor (Hagiwara *et al.*, 2017). It has been reported that these two activator-like proteins play a key role in the regulation of *Cyp51A* gene expression by binding to two conserved sequences in the promoter region (Blosser and Cramer, 2012; Chung *et al.*, 2014; Hagiwara *et al.*, 2017; Willger *et al.*, 2008). For instance, functional analyses using mutagenesis revealed that *AtrR* plays a crucial role in resistance to azole fungicides in *A. fumigatus*, *A. oryzae*, and *A. nidulans* through the regulation of genes involved in ergosterol biosynthesis (Hagiwara *et al.*, 2017). Likewise, a mutagenesis approach demonstrated the importance of *SrbA* in the resistance of *A. fumigatus* to the azole fungicides, including fluconazole and voriconazole (Willger *et al.*, 2008). Furthermore, chromatin immunoprecipitation followed by massively parallel DNA sequencing (ChIP-seq) assays confirmed the role of *SrbA* in the resistance to azoles and the regulation of ergosterol biosynthesis and revealed new roles for *SrbA*, including nitrate assimilation and heme biosynthesis (Chung *et al.*, 2014). Interestingly, both transcription factors *SrbA* and *AtrR* are present in S755 and Rs552, thus explaining at least the low basal *Cyp51A* expression recorded in S755. Nevertheless, we detected more transcription factor binding sites in Rs552 (seven DNA binding sites) than in S755 (three DNA binding sites), which could correlate with the increased expression of *Cyp51A* scored in Rs552. Indeed, it is likely that an occurrence of increased copies of transcription factor binding sites

would enhance the rate of gene expression, by probably allowing more bindings events between the transcription factors and the corresponding bonding sites (Das *et al.* 2017). However, to determine the role of these binding sites in Rs552 and S755 and their associated transcription factors, further functional assays would be required.

The last hypothesis concerns efflux pumps in *V. inaequalis*, whose multiple resistance to fungicides has not been directly linked to efflux pumps (Chatzidimopoulos *et al.*, 2022). Tolnaftate, a pump substrate of ABC transporters and MFS pumps, has previously been used for the MDR phenotype on other plant pathogenic fungi (Omrane *et al.*, 2015). High levels of tolnaftate resistance (>25 and >100) between wild-type and resistant strains of *B. cinerea* have only been calculated for MDR strains with efflux pumps involved in the resistance mechanism (Kretschmer *et al.*, 2009; Leroux and Walker, 2013). This level of resistance is determined by a ratio between the level of activity of a resistant strain and the level of activity of a sensitive strain (e.g.: IC₅₀ S/IC₅₀ R). Thus, as tolnaftate showed no antifungal activity on Rs552, efflux pumps may contribute to the reduced sensitivity of this strain to azoles and probably to other fungicides.

Several EPMs have already shown synergy with azoles, particularly in strains overexpressing ABC transporters (Hayashi *et al.*, 2002a). Amitriptyline and chlorpromazine have been identified as modulators of ABC transporters, but also verapamil, which potentially blocks both ABC and MFS pumps (Hayashi *et al.*, 2003; Leroux and Walker, 2013). The addition of amitriptyline and chlorpromazine appears to enhance the activity of tebuconazole in sensitive and reduced sensitivity strains. These results indicate the presence of at least one efflux pump capable of facilitating tebuconazole efflux. IRs were higher with chlorpromazine than with amitriptyline, indicating that amitriptyline may have less binding affinity with the transporter than chlorpromazine at the concentrations tested. Hayashi *et al.* (2003) showed that the more resistant *B. cinerea* strains were to oxpoconazole, the greater their synergy with chlorpromazine. Thus, the higher IRs on Rs552 with chlorpromazine may indicate an increase in efflux for this strain. Chlorpromazine has previously shown synergistic activity with tebuconazole on sensitive and resistant strains of *B. cinerea*, and IR values appear to be linked to the level of expression of *BcatrD* (gene encoding an ABC transporter) (Leroux and Walker, 2013). Furthermore, synergy with tolnaftate was also observed with chlorpromazine, with a high IR on Rs552, which was only noticed on MDR strains of *Z. tritici* strains (Leroux and Walker, 2010). In contrast to chlorpromazine, the combination of verapamil with tebuconazole and tolnaftate resulted in additive interactions. As suggested by Hayashi *et al.* (2003), ABC transporters may have one or more specific receptors for modulators and, therefore, verapamil may have less affinity for these receptors than chlorpromazine at these concentrations.

The higher IR in the Rs552 strain suggests that efflux is more important in this strain. At least two transporters are involved in azole efflux in *B. cinerea*, including

the ABC transporter *BcatrD* and the MFS pump, *Bcmfs1* (Hayashi *et al.*, 2002a, 2002b; Leroux and Walker, 2013). To this purpose, an analysis was carried out to identify the genes encoding the ABC transporter and the MFS pump from the two genomic sequences of the two *V. inaequalis* strains. No polymorphisms were found in the *MFS1* gene or in the promoter region. However, several mutations were found in the genes encoding the ABC pump. It is not easy to say whether these mutations have an impact or not on the protein. Analysis of the promoter regions of the *ABC1* and *ABC4* genes revealed the presence of the AtrR transcription factor binding motif. For both genes, this motif was found three times in both strains. Consequently, this motif would not necessarily be involved in the greater efflux of tebuconazole in Rs552. However, insertions of 8 and 17 bases in the upstream region of *ABC1* in S755 may displace AtrR binding sites, potentially limiting gene expression.

3.5.3. Lipid composition and vesicle formation may play a role in the reduced sensitivity of Rs552 to fengycin.

As lipopeptides interact with membrane lipids, a comparison of lipid composition between the two strains of *V. inaequalis* was performed to better understand fungal variability in sensitivity to fengycin. No quantitative distinction was recorded between the two strains with regard to total sterols and phospholipids as a whole. Nevertheless, some differences were observed in lipid analysis, particularly in ergosta-7,22-dien-3-ol, PI(16:0/18:1), LPC(C16:0), LPC(C18:0), LPE(16:0), and LPE(C18:1). These differences may be associated with the variability in sensitivity obtained between S755 and Rs552.

The fungal plasma membrane is made up of a lipid bilayer mainly composed of phospholipids (Weete, 2012). Ergosterol, the second major component, regulates the fluidity and permeability of the membrane (Deacon, 2006 ; Pan *et al.*, 2018 ; Stephenson, 2010). Although Vijaya Palani and Lalithakumari (1999) found no disparity in ergosterol levels between penconazole-sensitive and -resistant strains; Shirane *et al.* (1996) found differences in ergosterol derivatives between fenarimol-sensitive and -resistant strains of *V. inaequalis*, with the resistant strain containing more ergosterol than the sensitive strain. However, it is not clear whether ergosterol affects the mode of action of fengycin, with some reports suggesting a lesser antagonistic effect of ergosterol than cholesterol on fengycin activity. Interesting, Vanittanakom *et al.* (1986) demonstrated the formation of complexes between fengycin and ergosterol. Other studies have shown that the activity of fengycin is negatively correlated with the ergosterol content; as the amount of ergosterol increases (*in vitro* experiments or on artificial membrane models), the bioactivity of fengycin decreases. (Botcazon *et al.*, 2022; Mantil *et al.*, 2019b; Wise *et al.*, 2014). These findings are consistent with our results showing significantly higher proportions of ergosta-7,22-dien-3-ol in Rs552 compared to S755. The higher level of this compound may contribute to the reduced sensitivity of Rs552 to fengycin. However, iturinic compounds are also capable of interacting with ergosterol in an *in vitro* membrane

simulation system (Maget-Dana and Peypoux, 1994; Nasir and Besson, 2012). If the membrane proportions of ergosterol are different in our biological membranes, we would therefore expect variations in sensitivity to iturin or mycosubtilin between the two strains of *V. inaequalis*, which is not the case.

Phospholipids also play an essential role in membrane composition and interaction with fengycin. Rs552 and S755 contain mainly PI, PE and PC, which differs from the well-known composition of the yeast plasma membrane, where the majority of phospholipids are PS, followed by PI, PE and PC (Van Meer *et al.*, 2008). PI and its derivatives, phosphoinositides, are key mediators in signal transduction (El-Bacha and Torres, 2016). They can also dynamically recruit soluble and membrane proteins by phosphorylation and dephosphorylation (Harayama and Riezman, 2018). Lysophospholipids are also messenger lipids. They can easily leave the membrane, as they only have a single fatty acid (Tan *et al.*, 2020). The presence of short, unsaturated fatty acids in phospholipids increases membrane fluidity, which increases membrane sensitivity to fengycin (Vanittanakom *et al.*, 1986; Wise *et al.*, 2014). In S755, there is more PI(C16:0/C18:1) than in Rs552 (Figure article 10C), which could explain the greater sensitivity of this strain to fengycin, disrupting the membrane and leading to cell death. Negatively charged lipids (PG, PI and PS), short-chain unsaturated fatty acids (phospholipids) and a low concentration of ergosterol (Mantil *et al.*, 2019c; Wise *et al.*, 2014; Zakharova *et al.*, 2019), have also been shown to play a key role in membrane fluidity, promoting the interaction between fengycin and fungal plasma membranes. In the activity of fengycin, the role of phospholipids has nevertheless been mentioned as secondary to that of ergosterol (Mantil *et al.*, 2019a). These results were mainly observed using a cell membrane simulation system *in vitro*, and it is not yet clear whether this can be transposed *in vivo*.

Fengycin induced morphological and cytological changes with the formation of vesicles in the mycelium of both strains, but with a lower occurrence in Rs552. These vesicles resemble a swelling of the cell until it bursts. Morphological changes in fungal mycelium after treatment with fengycin have already been described in the literature. Vanittanakom *et al* (1986) demonstrated the existence of bulging in certain fungi. Zhang and Sun (2018) and Xue *et al.*(2023) showed the formation of vesicles in *P. grisea* and *F. oxysporum* that were about to burst or had burst at the hyphal level. Vesicles were also observed in *B. cinerea* in the presence of fengycin (Botcazon *et al.*, 2022). The same spherical vesicle shapes were observed in *S. Sclerotiorum* (Yang *et al.*, 2020) and *Alternaria solani* (Mu *et al.*, 2023) in contact with filtrates of *B. amyloliquefaciens* containing fengycin. The formation of such a structure may be due to the mode of action of fengycin targeting plasma membranes, ultimately leading to cell leakage and membrane rupture, as well as cell wall synthesis. In its interaction with the membrane, it is likely that fengycin directly or indirectly influences the synthesis of wall components. As the cell wall of *V. inaequalis* is composed of glucans, mannans and chitin (Rocafort *et al.*, 2023), it is possible that fengycin

disrupts membrane enzymes such as glucan synthase and chitin synthase, for example, which may be involved in vesicle generation.

3.6. Conclusion

Our findings suggest that the reduced sensitivity of Rs552 to azole fungicides is likely mainly due to a constitutive increased expression of *Cyp51A* coupled with an increased efflux by membrane pumps. Increased *Cyp51A* expression may or may not lead to increased ergosterol levels in the fungal plasma membrane. Hence, the similar sensitivity of both strains highlighted to the iturin family lipopeptides iturin A and mycosubtilin suggests that the rates of ergosterol in the membrane are not altered, in both strains, despite increased proportions of total ergosta-7,22-dien-3-ol were recorded in Rs552. By contract, the reduced sensitivity to fengycin in Rs552 was correlated with low vesicle formation in fungal hyphae, which could result from changes in membrane phospholipid composition. Although the overactivity of the membrane efflux pump is probably involved in the reduced sensitivity to azoles, the involvement of this mechanism in the reduced sensitivity to fengycin was not clearly demonstrated since it depends on whether the biomolecule enters the fungal cells. Curiously, in the presence of EPM, fengycin did not exhibit any synergism, suggesting that entry of fengycin into fungal cells is unlikely. Hence, the reduced sensitivity to fengycin in Rs552 does not appear to be attributable to a mechanism of cellular uptake and efflux. Nevertheless, a high preponderance of efflux pumps in the fungal plasma membrane could affect the interaction of fengycin with membrane lipids via an indirect physical effect such as competition.

Author statement :

Conceptualization, A.L., J.M., M.D., F.C. and P.J. Data curation, J.M.; F.C. Formal analysis, A.L., J.J., V.F., J.M., C.D., P.T., P.C., A.F., K.S., M.Du., M.D., F.L., A.L.S., A.S., F.C. Funding acquisition, J.M., F.C., M.D. and P.J. Investigation, A.L., J.J., F.L., A.H. and M.Du. Methodology, A.L., J.J., P.T., A.S., F.L., P.C., A.F., A.L.S., K.S., F.C., J.M. Project administration, F.C., J.M., M.D. and P.J. Ressources, C.D., M.Du. Software, K.S. Supervision, F.C., J.M., M.D. and P.J. Validation, F.C., J.M., M.D. and P.J. Visualization, A.L., A.S., A.F. Writing - preparation, A.L., J.J., J.M., A.S., F.C., M.D. and P.J. Writing review and editing, F.C., J.M., M.D. and P.J. All authors have read and approved the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Hauts-de-France Regional Council (France), the CPER BiHauts Eco de France (France), with co-funding from Junia (France), the FNRS (Belgium) and the University of Liège (Belgium).

Conflict of interest: Most of the authors declare no conflicts of interest. F.C. and P.J. are co-founders of Lipofabrik company (Elephant Vert group).

References

- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1713, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>.
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., 2023. Recent advances on the interaction of glycolipid and lipopeptide biosurfactants with model and biological membranes. *Curr. Opin. In Colloid Interface Sci.* 68, 101748. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2023.101748>.
- Bailey, T.L., Elkan, C., 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 2, 28-36. PMID : 7584402.
- Bechet, M., Guy-Castera, J., Guez, J.S., Chihib, N., Coucheney, F., Coutte, F., Fickers, P., Leclere, V., Wathelet, B., Jacques, P., 2013. Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutant of *Bacillus subtilis* mutants. *Bioresour. Technol.* 145, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.123>.
- Bedart, C., Renault, N., Chavatte, P., Porcherie, A., Lachgar, A., Capron, M., Farce, A., 2022. Sinaps : A software tool for analysis and visualization of interaction networks of molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.* 62, 1425-1436. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00854>.
- Blosser, S.J., Cramer, R.A., 2012. SREBP-dependent triazole susceptibility in *Aspergillus fumigatus* is mediated through direct transcriptional regulation of *erg11a* (*Cyp51A*). *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 248-257. <https://doi.org/10.1128/aac.05027-11>.
- Botcazon, C., Bergia, T., Lecouturier, D., Dupuis, C., Rochex, A., Acket, S., Nicot, P., Leclère, V., Sarazin, C., Rippe, S., 2022. Rhamnolipids and fengycins, very promising amphiphilic antifungal compounds from bacteria secretomes, act on *Sclerotiniaceae* fungi through different mechanisms. *Front. Microbiol.* 13, 977633. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.977633>.
- Bowen, J.K., Mesarich, C.H., Bus, V.G.M., Beresford, R.M., Plummer, K.M., Templeton, M.D., 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Mol. Plant Pathol.* 12, 105-122. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00656.x>.
- Buske, F.A., Bodén, M., Bauer, D.C., Bailey, T.L., 2010. Assigning roles to DNA regulatory motifs using comparative genomics. *Bioinform.* 26, 860-866. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq049>.
- Case, D.A., Ben-Shalom, I.Y., Brozell, S.R., Cerutti, D.S., Cheatham III, T.E., Cruzeiro, V.W.D., Darden, T.A., Duke, R.E., Ghoreishi, D., Giambasu, G., Giese, T., Gilson, M.K., Gohlke, H., Goetz, A.W., Greene, D., Harris, R., Homeyer, N., Huang, Y., Izadi, S., Kovalenko, A., Krasny, R., Kurtzman, T., Lee, T.S., legrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Man, V., Mermelstein, D.J., Merz, K.M., Miao, Y., Monard, G., Nguyen, C., Nguyen, H., Onufriev, A., Pan, F., Qi, R., Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C.L., Smith, J., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wei, H., Wilson, L., Wolf, R.M., Wu, X., Xiao,

L., Xiong, Y., York, D.M., Kollman, P. A., 2019. AMBER 2019, University of California, San Francisco.

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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>.

Chatzidimopoulos, M., Zambounis, A., Lioliopoulou, F., Vellios, E., 2022. Detection of *Venturia inaequalis* Isolates with Multiple Resistance in Greece. *Microorganisms* 10, 2354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122354>.

Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A.D., Reignault, P., Halama, P., 2017. Evolution of qoi resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in northern France. *Crop Prot.* 92, 131-133. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.017>.

Chowdhury, S.P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin, P., Borriess, R., Hartmann, A., 2015. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *rhizoctonia solani*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 984-995. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-15-0066-R>.

Chung, D., Barker, B.M., Carey, C.C., Merriman, B., Werner, E.R., Lechner, B.E., Dhingra, S., Cheng, C., Xu, W., Blosser, S.J., Morohashi, K., Mazurie, A., Mitchell, T.K., Haas, H., Mitchell, A.P., Cramer, R.A., 2014. Chip-seq and *in vivo* transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP srba reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *Plos Pathog.* 10, e1004487. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004487>.

Colby, S.R., 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* 15, 20-22. <https://doi.org/10.2307/4041058>.

Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag. Sci.* 69, 150-155. <https://doi.org/10.1002/ps.3348>.

Cordero-Limon, L., Shaw, M.W., Passey, T.A., Robinson, J.D., Xu, X., 2020. Cross-resistance between myclobutanil and tebuconazole and the genetic basis of tebuconazole resistance in *Venturia inaequalis*. *Pest Manag. Sci.* 77, 844-850. <https://doi.org/10.1002/ps.6088>.

Das, D., Dey, S., Brewster, R.C., Choubey, S. 2017. Effect of transcription factor resource sharing on gene expression noise. *Plos Comput. Biol.* 13(4), e1005491. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005491>

Deacon, J.W., 2006. Fungal biology, fourth edition, Blackwell Publishing Ltd, Malden.

Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2008. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* 94, 2667-2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.

Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 283, 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>.

Deravel, J., Lemièrre, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., Jacques, P., 2014. Mycosubtilin and surfactin are efficient low ecotoxic molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255-6264. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>.

Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., Jacques, P., 2019. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides against two *Venturia inaequalis* strains with different sensitivity to tebuconazole. *Front. Microbiol.* 10, 2327. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>.

Dussert, E., Tourret, M., Dupuis, C., Noblecourt, A., Behra-Miellet, J., Flahaut, C., Ravallec, R., Coutte, F., 2022. Evaluation of Antiradical and Antioxidant Activities of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strains. *Front. Microbiol.* 13: 914713. Doi: 10.3389/fmicb.2022.914713.

El-Bacha, T., Torres, A.G., 2016. Phospholipids: Physiology, in: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, pp. 352-359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00540-7>.

Ermakova, E., Zuev, Y., 2017. Effect of ergosterol on the fungal membrane properties. All-atom and coarse-grained molecular dynamics study. *Chem. Phys. Lipids* 209, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.11.006>.

Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T.J., 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* 39, 869-878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>.

Gilliard, G., Furlan, A.L., Smeralda, W., Pršić, J., Deleu, M., 2022. Added value of biophysics to study lipid-driven biological processes: The case of surfactins, a class of natural amphiphilic molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13831. <https://doi.org/10.3390/ijms232213831>.

Hagiwara, D., Miura, D., Shimizu, K., Paul, S., Ohba, A., Gonoï, T., Watanabe, A., Kamei, K., Shintani, T., Moye-Rowley, W.S., Kawamoto, S., Gomi, K., 2017. A novel transcription factor Zn2-Cys6 attr plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by coregulating *Cyp51A* and *cdr1b* expressions. *Plos Pathog.* 13, e1006096. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006096>.

Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K., Hibi, T., 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 α -demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3421-3426. <https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3421-3426.2000>.

Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 281-296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.

Hayashi, K., Schoonbeek, H., De Waard, M.A., 2003. Modulators of membrane drug transporters potentiate the activity of the DMI fungicide oxpoconazole against *Botrytis cinerea*. *Pest. Manag. Sci.* 59, 294-302. <https://doi.org/10.1002/ps.637>.

Hayashi, K., Schoonbeek, H., Waard, M., 2002a. Expression of the ABC transporter *bcatrd* from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor

fungicides. Pestic. Biochem. Phys. 73, 110-121. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00015-9).

Hayashi, K., Schoonbeek, H.-J., De Waard, M.A., 2002b. *Bcmfs1*, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4996-5004. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4996-5004.2002>.

He, H., Yang, M., Li, S., Zhang, G., Ding, Z., Zhang, L., Shi, G., Li, Y., 2023. Mechanisms and biotechnological applications of transcription factors. Syn. Syst. Biotechnol. 8, (4), 565-577. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2023.08.006>.

Hoffmeister, M., Zito, R., Böhm, J., Stammler, G., 2021. Mutations in Cyp51 of *Venturia inaequalis* and their effects on DMI sensitivity. J. Plant Dis. Prot. 128, 1467-1478. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00516-0>.

Hulvey, J., Popko, J.T., Sang, H., Berg, A., Jung, G., 2012. Overexpression of *shcyp51b* and *shatrd* in *Sclerotinia homoeocarpa* isolates exhibiting practical field resistance to a demethylation inhibitor fungicide. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6674-6682. <https://doi.org/10.1128/AEM.00417-12>.

Jacques, P., 2011. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp, in : Soberón-Chávez, G. (Ed.), Biosurfactants, Microbiology Monographs. Springer Berlin, Berlin, Heidelberg, pp. 57-91. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_3.

Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., 1995. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. J. Mol. Biol. 245, 43-53. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(95\)80037-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(95)80037-9).

Khajuria, Y.P., Akhoun, B.A., Kaul, S., Dhar, M.K., 2022. Secretomic insight into the pathophysiology of *Venturia inaequalis*: the causative agent of scab, a devastating apple tree disease. Pathogens. 12(1):66. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010066>.

Kretschmer, M., Leroux, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M.A., Hahn, M., 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. Plos Pathog. 5, e1000696. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>.

Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., Coutte, F., 2022. Assessment of lipopeptides mixtures produced by *Bacillus subtilis* as biocontrol products against apple scab (*Venturia inaequalis*). Microorganisms 10, 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>.

Leroux, P., Walker, A.-S., 2013. Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. Eur. J. Plant Pathol. 135, 683-693. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0105-3>.

Leroux, P., Walker, A.-S., 2010. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest. Manag. Sci. 67, 44-59. <https://doi.org/10.1002/ps.2028>.

Lichtner, F.J., Jurick, W.M., Ayer, K.M., Gaskins, V.L., Villani, S.M., Cox, K.D., 2020. A Genome Resource for Several North American *Venturia inaequalis* Isolates with Multiple Fungicide Resistance Phenotypes. *Phytopathology* 110, 544–546. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-19-0222-A>

Linde, J., Hortschansky, P., Fazius, E., Brakhage, A.A., Guthke, R., Haas, H., 2012. Regulatory interactions for iron homeostasis in *Aspergillus fumigatus* inferred by a Systems Biology approach. *BMC Syst Biol* 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-6>

Liu, C.H., Chen, X., Liu, T.T., Lian, B., Gu, Y., Caer, V., Xue, Y. R., Wang, B.T., 2007. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 459–466. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1010-0>.

Maget-Dana, R., Peypoux, F., 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87, 151–174. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90159-7).

Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74, 1047–1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V).

Mantil, E., Buznytska, I., Daly, G., Lanoul, A., Avis, T. J., 2019a. Role of lipid composition in the interaction and activity of the antimicrobial compound Fengycin with complex membrane models. *J. Membr. Biol.* 252:627–638. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00100-6>.

Mantil, E., Crippin, T., Avis, T.J., 2019b. Supported lipid bilayers using extracted microbial lipids: domain redistribution in the presence of fengycin. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 178, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.050>.

Mantil, E., Crippin, T., Avis, T.J., 2019c. Domain redistribution within ergosterol-containing model membranes in the presence of the antimicrobial compound fengycin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1861, 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.01.003>.

Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., Harrison, S.C., 1992. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 356, 408–414. <https://doi.org/10.1038/356408a0>.

Mejri, S., Siah, A., Coutte, F., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Tisserant, B., Krier, F., Jacques, P., Reignault, P., Halama, P., 2018. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29822–29833. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>.

Moyne, A.L., Shelby, R., Cleveland, T.E., Tuzun, S., 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>.

Mu, F., Chen, X., Fu, Z., Wang, X., Guo, J., Zhao, X., Zhang, B., 2023. Genome and transcriptome analysis to elucidate the biocontrol mechanism of *Bacillus*

amyloliquefaciens XJ5 against *Alternaria solani*. *Microorganisms*, 11, 2055. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082055>.

Muchembled, J., Deweer, C., Sahmer, K., Halama, P., 2018. Antifungal activity of essential oils on two *Venturia inaequalis* strains with different sensitivities to tebuconazole. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29921-29928. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0507-z>.

Nasir, M.N., Besson, F., 2012. Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818, 5, 1302-1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.020>.

Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A.-S., Fillinger, S., 2015. Fungicide efflux and the *mgmfs1* transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environ. Microbiol.* 17, 2805-2823. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12781>.

Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant diseases biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9(4):1084-90. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.

Pan, J., Hu, C., Yu, J.-H., 2018. Lipid biosynthesis as an antifungal target. *J. Fungi* 4, 50. <https://doi.org/10.3390/jof4020050>.

Paul, S., Stamnes, M., Thomas, G.H., Liu, H., Hagiwara, D., Gomi, K., Filler, S.G., Moye-Rowley, W.S., 2019. Attr Is an Essential Determinant of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Mbio* 10, e02563-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.02563-18>

Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2015. Azole fungicides -- understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest. Manag. Sci.* 71, 1054-1058. <https://doi.org/10.1002/ps.4029>.

Rahman, A., Uddin, W., Wenner, N.G., 2015. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Mol. Plant Pathol.* 16, 546-558. <https://doi.org/10.1111/mpp.12209>.

Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies, J., 2016. Jspeciesws: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32, 929-931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

Rocafort, M., Srivastava, V., Bowen, J.K., Díaz-Moreno, S.M., Guo, Y., Bulone, V., Plummer, K.M., Sutherland, P.W., Anderson, M.A., Bradshaw, R.E., Mesarich, C.H., 2023. Cell wall carbohydrate dynamics during the differentiation of infection structures by the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*. *Microbiol. Spectr.* 11(3):e0421922. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04219-22>.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The Iturin and Fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus*

subtilis towards *Podosphaera fusca*. Mol. Plant Microbe Interact. 20, 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat. Protoc. 3, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

Schnabel, G., Jones, A.L., 2001. The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. Phytopathology 91, 102-110. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.102>.

Shirane, N., Takenaka, H., Ueda, K., Hashimoto, Y., Katoh, K., Ishii, H., 1996. Sterol analysis of DMI-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis*. Phytochemistry 41, 1301-1308. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00787-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00787-3).

Siah, A., Tisserant, B., El Chartouni, L., Duyme, F., Deweer, C., Roisin-Fichter, C., Sanssené, J., Durand, R., Reignault, P., Halama, P., 2010. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* : widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. Fungal Biol. 114, 980-990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.008>.

Song, J., Zhang, S., Lu, L., 2018. Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: what we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance. Fungal Biol. Rev. 32, 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.05.001>.

Stammler, G., Cordero, J., Koch, A., Semar, M., Schlehuber, S., 2009. Role of the Y134F mutation in *cyp51* and overexpression of *cyp51* in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole. Crop Prot. 28, 891-897. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.05.007>.

Stephenson, S.L., 2010. The Kingdom fungi: the biology of mushrooms, molds, and lichens. Timber Press, Portland.

Sun, X., Xu, Q., Ruan, R., Zhang, T., Zhu, C., Li, H., 2013. Pdmle1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance. Environ. Microbiol. Rep. 5, 135-142. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12012>.

Talebi, A., de Laat, V., Spotbeen, X., Dehairs, J., Rambow, F., Rogiers, A., Vanderhoydonc, F., Rizotto, L., Planque, M., Doglioni, G., Motamedi, S., Nittner, D., Roskams, T., Agostinis, P., Bechter, O., Boecxstaens, V., Garmyn, M., O'Farrell, M., Wagman, A., Kemble, G., Leucci, E., Fendt, S.-M., Marine, J.-C., Swinnen, J.V., 2023. Pharmacological induction of membrane lipid polyunsaturation sensitizes melanoma to ROS inducers and overcomes acquired resistance to targeted therapy. J. Exp. Clin. Cancer Res. 42, 92. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02664-7>.

Tan, S.T., Ramesh, T., Toh, X.R., Nguyen, L.N., 2020. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. Prog. Lipid. Res. 80, 101068. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101068>.

Todd, B.L., Stewart, E.V., Burg, J.S., Hughes, A.L., Espenshade, P.J., 2006. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. Mol Cell Biol 26, 2817-2831. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2817-2831.2006>

Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.

Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G., 1986. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* 39, 888-901. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>.

Vassaux, A., Rannou, M., Peers, S., Daboudet, T., Jacques, P., Coutte, F., 2021. Impact of the purification process on the spray-drying performance of three families of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 815337. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.815337>.

Vijaya Palani, P., Lalithakumari, D., 1999. Resistance of *Venturia inaequalis* to the sterol biosynthesis inhibiting fungicide, penconazole [1-(2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl)-1H-1,2,4-triazole]. *Mycol. Res.* 103, 1157-1164. <https://doi.org/10.1017/S0953756299008321>.

Villani, S.M., Biggs, A.R., Cooley, D.R., Raes, J.J., Cox, K.D., 2015. Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis.* 99, 1526-1536. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0002-RE>.

Villani, S.M., Hulvey, J., Hily, J.-M., Cox, K.D., 2016. Overexpression of the *CYP51A1* gene and repeated elements are associated with differential sensitivity to DMI fungicides in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 106, 562-571. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-15-0254-R>.

Weete, J.D., 2012. Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Springer New York.

Willger, S.D., Puttikamonkul, S., Kim, K.-H., Burritt, J.B., Grahl, N., Metzler, L.J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C.B., Jr, R.A.C., 2008. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Plos Pathog.* 4, e1000200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200>.

Wise, C., Falardeau, J., Hagberg, I., 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, 1036-1041. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0336-R>.

Wood, D.E., Salzberg, S.L., 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15, R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>.

Xu, X.-M., Gao, L.-Q., Yang, J.-R., 2010. Are insensitivities of *Venturia inaequalis* to myclobutanil and fenbuconazole correlated? *Crop Prot.* 29, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.07.002>

Xue, J., Sun, L., Xu, H., Gu, Y., Lei, P., 2023. *Bacillus atrophaeus* NX-12 utilizes exosmotic glycerol from *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Cucumerinum* for fengycin production. *J. Agric. Food Chem.* 71, 10565-10574. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01276>.

Yaegashi, H., Hirayama, K., Akahira, T., Ito, T., 2020. Point mutation in *CYP51A1* of *Venturia inaequalis* is associated with low sensitivity to sterol demethylation

inhibitors. J. Gen. Plant Pathol. 86, 245-249. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00924-4>.

Yang, X., Zhang, L., Xiang, Y., Du, L., Huang, X., Liu, Y., 2020. Comparative transcriptome analysis of *Sclerotinia sclerotiorum* revealed its response mechanisms to the biological control agent, *Bacillus amyloliquefaciens*. Sci. Rep. 10, 12576. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69434-9>.

Zakharova, A.A., Efimova, S.S., Malev, V.V., Ostroumova, O.S., 2019. Fengycin induces ion channels in lipid bilayers mimicking target fungal cell membranes. Sci. Rep. 9, 16034. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52551-5>.

Zhang, L., Sun, C., 2018. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine strains of *Bacillus subtilis*, kill the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. Appl. Environ. Microbiol. 84, e00445-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>.

4. Matériels et méthodes complémentaires

4.1. Activité antifongique

L'activité de la surfactine et du mélange fengycine/surfactine a été évaluée de la même manière que pour les autres conditions dans l'article ci-dessus partie 2.3 du matériels et méthodes. L'ensemble du protocole a été repris figure 3-1

Les lipopeptides testés ont été choisis en partie par leur disponibilité au sein du laboratoire. De plus, l'iturine A, la pumilacidine et la lichénysine permettaient de tester d'autres molécules appartenant à la famille, soit de la mycosubtiline soit de la surfactine. Cette analyse permettant de déterminer si les lipopeptides d'une même famille ont les mêmes activités. Les gammes de concentration ont été choisies à partir des tests réalisés par Desmyttere *et al.* (2019) et adapté pour améliorer la précision de la CI_{50} .

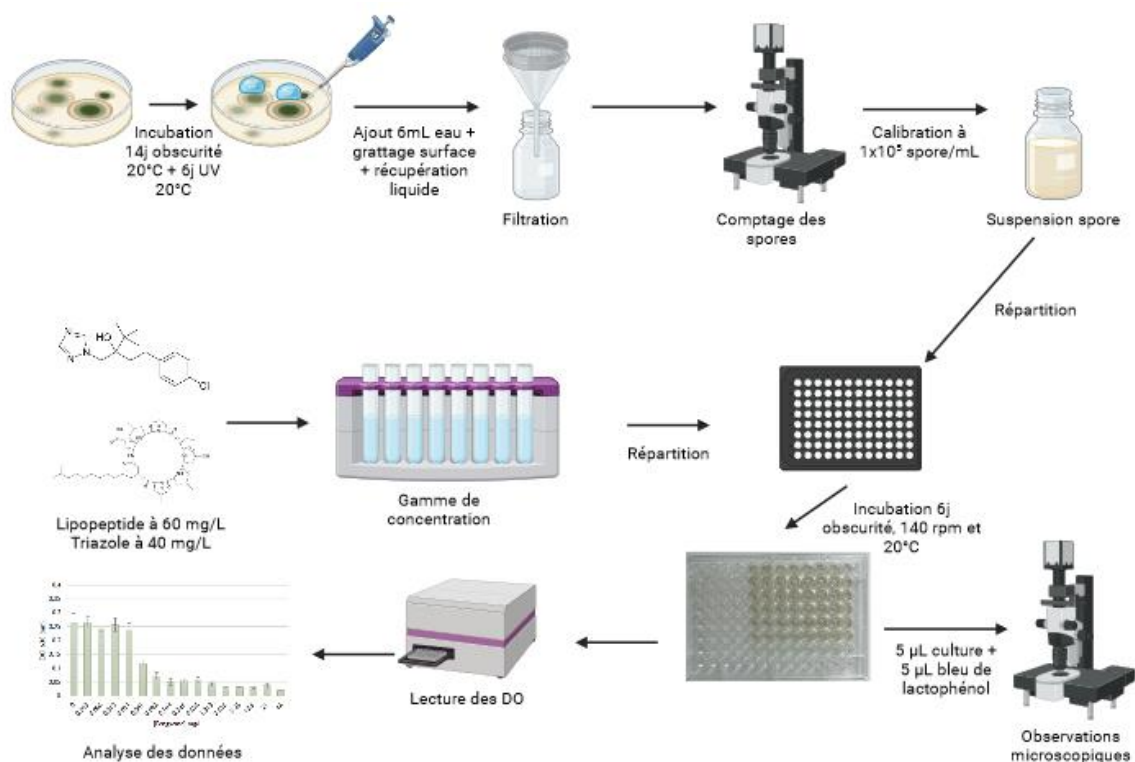


Figure 3-1 : Protocole d'activité antifongique *in vitro* des lipopeptides et des triazoles contre *V. inaequalis*.

4.2. Observations microscopiques du mycélium

L'effet des lipopeptides et des fongicides sur la morphologie du mycélium des deux souches S755 et Rs552 de *V. inaequalis* a été évalué par microscopie optique. Les observations ont été effectuées sur des échantillons de mycélium prélevés dans des microplaques à 96 puits complétés par un milieu liquide glucose peptone et incubés pendant six jours, préparés comme indiqué dans l'article partie 2.3 (Figure 3-1). Différentes concentrations ont été testées pour les différentes conditions. L'objectif a été de réaliser des observations sur des échantillons traités avec une concentration non inhibitrice, une concentration proche de la CI_{50} et une concentration inhibitrice de la croissance. Au total, deux ou trois échantillons ont été prélevés pour ces deux ou trois concentrations pour chaque souche et comparés à des témoins non traités. Les lames et les observations ont été réalisées comme décrit dans l'article paragraphe 2.5.

4.3. Extraction et analyse des acides gras totaux par GC-MS

L'extraction des acides gras se fait à partir de la fraction conservée lors de l'extraction des stérols (Tube α) (Fig. 3-2). Les échantillons sont acidifiés avec de l'HCl 6N jusqu'à pH 1, puis un mL d'eau et cinq mL d'hexane sont ajoutés et homogénéisés par vortex. Les acides gras de la phase supérieure sont récupérés. Cette étape est répétée deux fois sans ajout d'eau. La phase supérieure est concentrée par évaporation centrifuge. Les acides gras sont méthylés par addition de trois mL de tri fluorure de bore 12% dans du méthanol. Une mise à ébullition dans un bloc chauffant à 85°C a été effectuée pendant 5 min. La réaction est stoppée en plaçant le tube dans la glace. Ensuite, l'étape d'extraction a été réalisée avec de l'hexane comme précédemment. Les échantillons ont été concentrés puis repris dans deux mL d'hexane. Ils sont séchés à nouveau et repris avec 200 μ L d'hexane. Les acides gras ont été analysés à l'aide d'un chromatographe-spectromètre de masse en phase gazeuse (GC-MS) Shimadzu QP-2010 Ultra (Shimadzu, Japon) équipé d'un détecteur de masse à quadripôle unique et couplé simultanément à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les échantillons ont été injecté en mode fractionné (rapport de flux de gaz de 80:1, afin de ne pas saturer la colonne) sur une colonne capillaire rapide ZB-WAX (10 m de longueur x 0,1 mm de diamètre intérieur x 0,1 μ m d'épaisseur de phase, phase polyéthylène glycol, Zebron, Phenomenex Torrance Calif, U.S.A) en utilisant de l'hélium comme gaz vecteur à une vitesse linéaire constante (60 cm/sec). La température de l'injecteur était de 220 °C et celle du détecteur de 250 °C et de 200 °C pour le FID et la source d'ions, respectivement. Le programme de température a commencé par une température initiale de 75 °C et a augmenté de 50 °C toutes les minutes pour atteindre une température finale de 240 °C, qui a été maintenue pendant deux minutes. Le mode d'ionisation était l'impact électronique à 70 eV et la gamme de masse entre 5 et 600 u a été balayée. Le mode SIM a été utilisé simultanément. La quantification des acides gras a été réalisée en utilisant du C19:0 (Sigma-Aldrich) comme étalon interne. Cet étalon interne (C19 :0 = 50 μ g) a été intégré lors de l'ajout de l'étalon interne des stérols (Cholestérol = 30 μ g), avant la saponification directe. Les acides gras sont

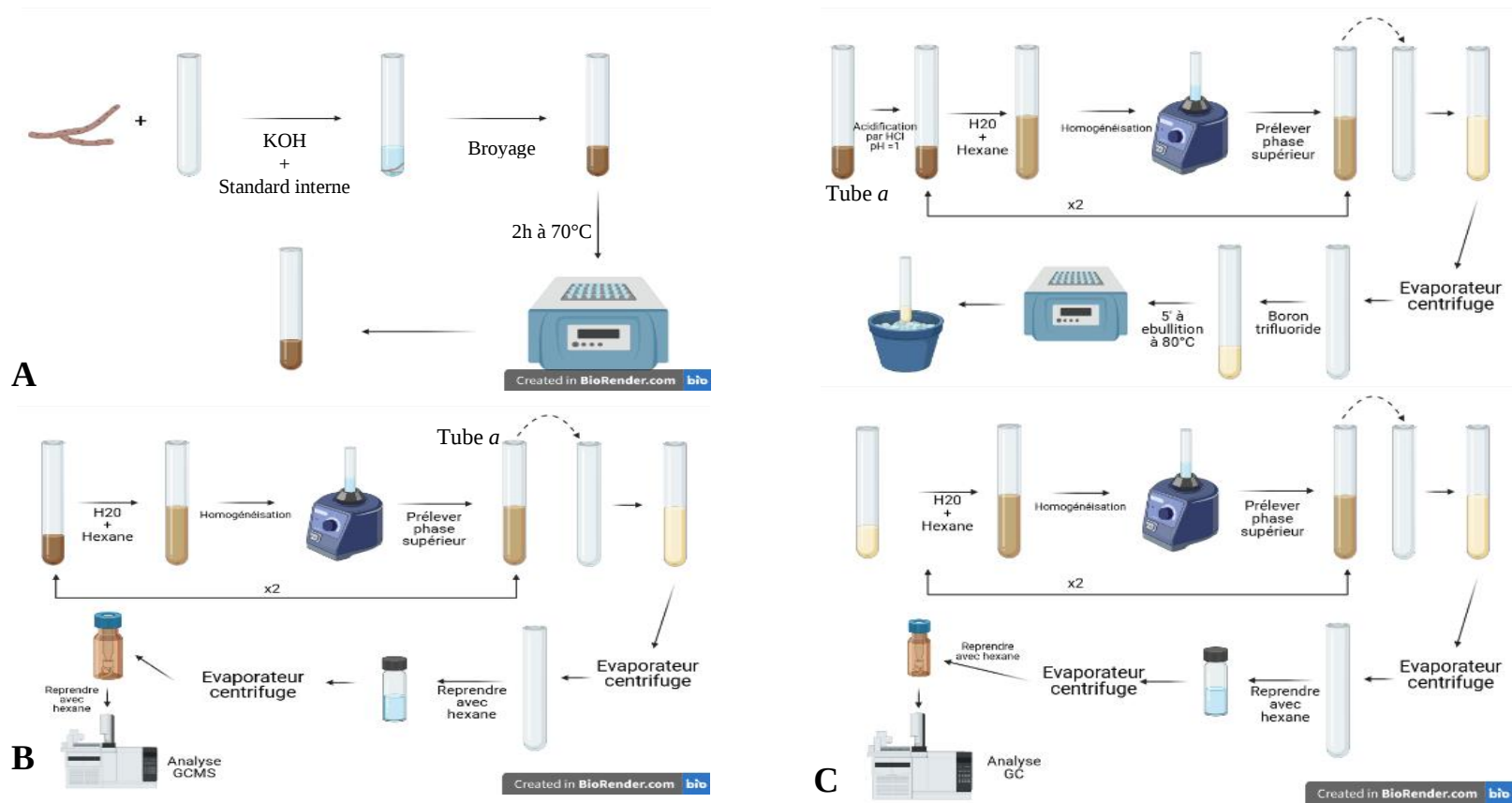


Figure 3-2 : Représentation du protocole d'extraction des stérols et des acides gras. A : saponification directe ; B : extraction des stérols ; C : extraction des acides gras.

identifiés en comparant leur temps de rétention relatif (Tableau 3-1) à celui des étalons commerciaux d'acides gras (Sigma-Aldrich) et en les comparant aux spectres obtenus à partir d'étalons commerciaux et/ou publiés dans la littérature (NIST Standard Reference Database). Trois répliques biologiques avec cinq répliques techniques par réplique biologique ont été réalisés pour chaque modalité.

Tableau 3-1: Temps de rétention des différents lipides analysés par GC-MS.

Lipides	Temps de rétention (min)
Standard: cholestérol	4,04
Squalène	3,57
Ergosta-5,24-dien-3-ol	4,24
Ergosta-5,8-dien-3-ol	4,29
Ergosta-7,22-dien-3-ol	4,33
Standard: C19 :0	20,14
C16 :0	16,08
C18 :0	18,77
C18 :1	19,16
C18 :2	19,76

4.4. Extraction et analyse des triglycérides par LC-MS

Tout comme les phospholipides, les triglycérides ont été extraits et analysés par Lipometrix (Leuven, Belgique) (Talebi *et al.*, 2023). Ces analyses ont été réalisées à partir d'environ 10 mg de mycélium lyophilisé des deux souches de *V. inaequalis*. Brièvement, les pellets de *V. inaequalis* et l'étalon interne ont été homogénéisés dans l'eau, puis les lipides ont été extraits avec 1 N HCl:CH₃OH 1:8 (v/v), CHCl₃ et 200 µg/mL d'antioxydants 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT). La phase organique a été récupérée et évaporée. Le culot a été solubilisé dans l'éthanol et analysé par chromatographie liquide en tandem avec un spectromètre de masse à ionisation par électro spray. Les triglycérides ont été mesurés en mode positif avec un balayage de perte neutre pour l'un des acyle gras. Les pics ont été intégrés à l'aide du logiciel MultiQuantTM. Les contributions isotopiques ont été utilisées pour corriger les signaux des espèces lipidiques. Enfin, la quantification a été effectuée conformément aux directives de la Lipidomics Standard Initiative (LSI). Trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque modalité.

4.5. Analyse statistique des lipides

La composition relative et la quantité absolue des lipides ont été analysées. Tous les composés représentant moins de 1% ont été exclus de l'analyse statistique. Les conditions d'utilisation (normalité et homoscedasticité) ont été vérifiées et validées. Sur la base des compositions relatives, une analyse de variance à un facteur a été réalisée à $p \leq 0,05$ pour déterminer s'il y avait une différence significative entre les deux souches. Les valeurs p ont été comparées à un risque α ajusté (ajustement de Bonferroni) en divisant le risque α global de 0,05 par le nombre maximum de molécules testées pour l'ensemble des analyses statistiques réalisées ($0,05/14=0,0035$).

5. Résultats complémentaires

5.1. Activité antifongique

L'activité antifongique de six lipopeptides (seuls ou en mélanges binaires) et de deux substances actives de la famille des triazoles a été évaluée vis-à-vis des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 (Figure 3-3). L'ensemble des valeurs obtenues se trouve en Annexe 2. Comme attendu, les deux souches ont montré des niveaux de sensibilité distincts au tébuconazole (valeurs CI_{50} de 0,012 et 1,153 mg/L pour S755 et Rs552, respectivement), confirmant ainsi des résultats antérieurs (Desmyttere *et al.*, 2019). Les deux souches ont également montré des niveaux distincts de sensibilité au tétraconazole (valeurs CI_{50} de 0,009 et 0,907 mg/L pour S755 et Rs552, respectivement). Des différences significatives dans les valeurs de CI_{50} ont été mises en évidence entre les deux souches pour la fengycine lorsqu'elle est testée seule (valeurs CI_{50} de 0,024 mg/L pour S755 et supérieures à 42 mg/L pour Rs552) ou en mélange avec l'iturine A, la surfactine, la lichénysine et la pumilacidine (Annexe 2). La surfactine montre une différence d'activité moins importante que la fengycine (valeurs CI_{50} de 4,259 mg/L pour S755 et de 17,919 mg/L pour Rs552). Il est intéressant de noter qu'aucune différence significative dans le niveau de sensibilité des deux souches n'a été observée vis-à-vis des autres lipopeptides évalués. Parmi les lipopeptides testés seuls, la lichénysine et la pumilacidine (famille des surfactines) n'ont exercé aucune activité significative, tandis que la mycosubtiline et l'iturine A (famille des iturines) ont montré une bonne activité antifongique contre les deux souches, avec une activité statistiquement plus forte pour la mycosubtiline par rapport à l'iturine A. Le lipopeptide le plus actif sur la souche S755 est la fengycine. Il est aussi surprenant d'observer que les lipopeptides fengycine, lichénysine et pumilacidine n'ont pas montré de bioactivités contre Rs552 lorsqu'ils ont été testés seuls, alors que les mélanges fengycine-lichénysine et fengycine-pumilacidine ont montré une activité antifongique significative contre cette souche (Figure 3-3). Un autre résultat surprenant est l'activité de la surfactine contre les deux souches de *V. inaequalis* alors que la lichénysine et la pumilacidine, deux lipopeptides de la même famille que la surfactine, n'ont pas d'activité antifongique contre les deux souches. Cela montre une différence d'activité au sein d'une même famille de lipopeptides. Ce résultat diffère de celui obtenu par Desmyttere *et al.* (2019) qui

n'avait pas mis en évidence une activité de la surfactine. De plus, les mélanges FS, FL et FP contre S755 ont un même niveau d'activité. Cependant, contre Rs552, les mélanges FL et FP ont une meilleure activité antifongique que le mélange FS. Ce mélange a la même activité que la surfactine seule. Cela montre que la fengycine et la surfactine n'ont pas d'effet synergique ensemble comparé aux mélanges FL et FP. Ces résultats complémentaires montrent que la fengycine a des interactions différentes avec les lipopeptides d'une même famille.

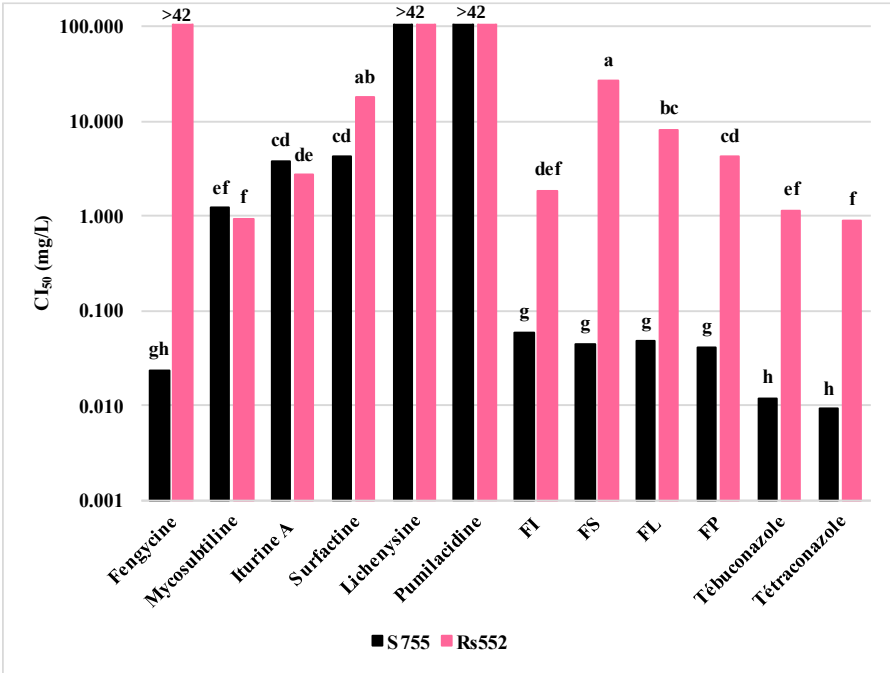


Figure 3-3 : Activité antifongique de six lipopeptides (fengycine, mycosubtiline, iturine A, surfactine, lichénysine, pumilacidine), de quatre de leurs mélanges binaires (fengycine-iturine A, fengycine-surfactine, fengycine-lichénysine, fengycine- pumilacidine) et de deux substances actives de la famille des triazoles (tébuconazole et tétraconazole) contre S755 et Rs552. Les barres, représentant les moyennes estimées, avec des lettres différentes indiquent une différence significative selon ANOVA 2 facteurs - Tukey test) à P=0.05.

5.2. Observations microscopiques du mycélium

Des observations au microscope optique ont été réalisées pour déterminer si des changements morphologiques du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* se produisaient en présence de lipopeptides. Dans la condition témoin, le mycélium était bien développé avec des hyphes longs et réguliers (Figure 3-4A,B). Aucune modification n'a été observée en présence de pumilacidine et lichénysine (Figure 3-6C,D,E et F). Pour S755 et Rs552 en présence de tébuconazole et de tétraconazole le mycélium semble bien développé tout comme pour les contrôles (Figure 3-5A,B,C et D). En présence de mycosubtiline et d'iturine A, un début de formation de vésicule est parfois observé sans toutefois conduire à des formes aussi complètes que les sphérules observées en présence de fengycine (Flèches violettes) (Figure 3-5E,F,G et H). En présence de fengycine (Figure 3-4C,D, E, E'et F), surfactine et des quatre mélanges (Figure 3-6A et B et Figure 3-7), des sphérules ont été observées sur les deux souches (Flèches rouges). Ces sphérules formaient un sac. Ce sac peut être légèrement gonflé ou former une grande vésicule claire. Cette sphérule peut rester intacte à différents stades de gonflement ou être fissurée relâchant son contenu cellulaire (Figure 3-4E,E',F). Il est intéressant de noter que ces vésicules semblent plus fréquentes dans la souche S755 que dans la souche Rs552 (Tableau 3-2). Les sphérules observées sont présentes sur les concentrations testées.

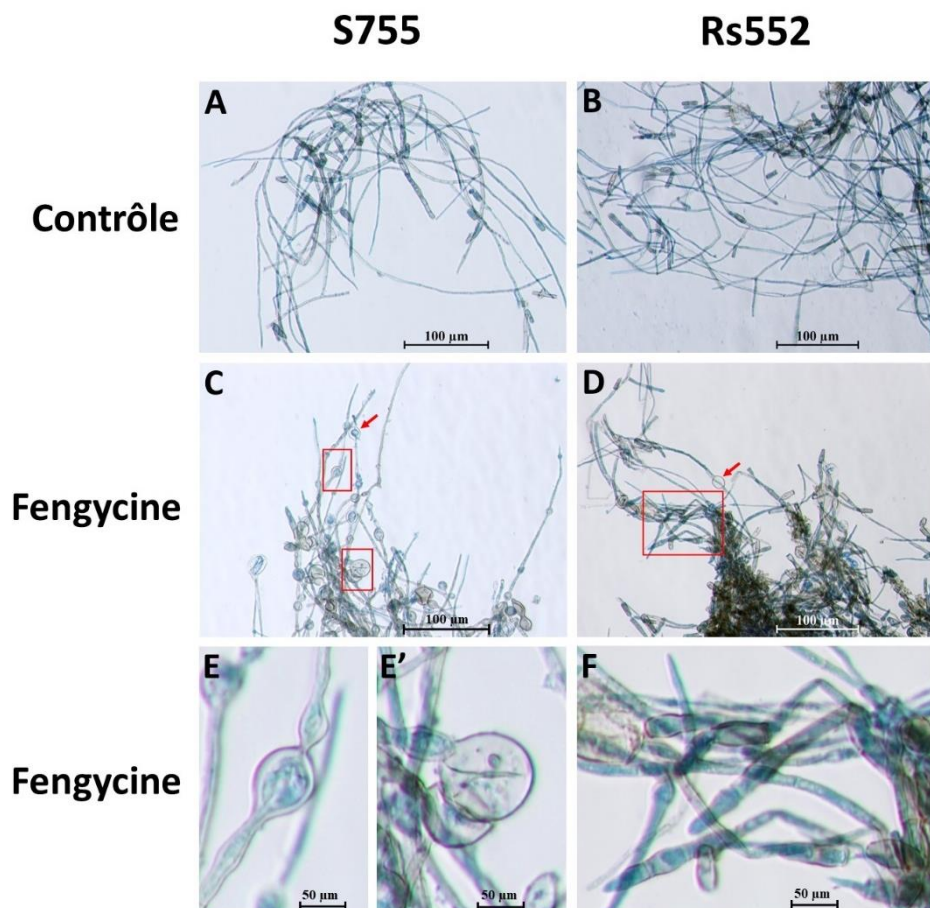


Figure 3-4 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 0,021 mg/L fengycine ; D, Rs552 à 42 mg/L fengycine ; E et E', Zoom sur les vésicules observées dans l'image C (rectangle) ; F, Zoom sur le mycélium observé dans l'image D (rectangle).

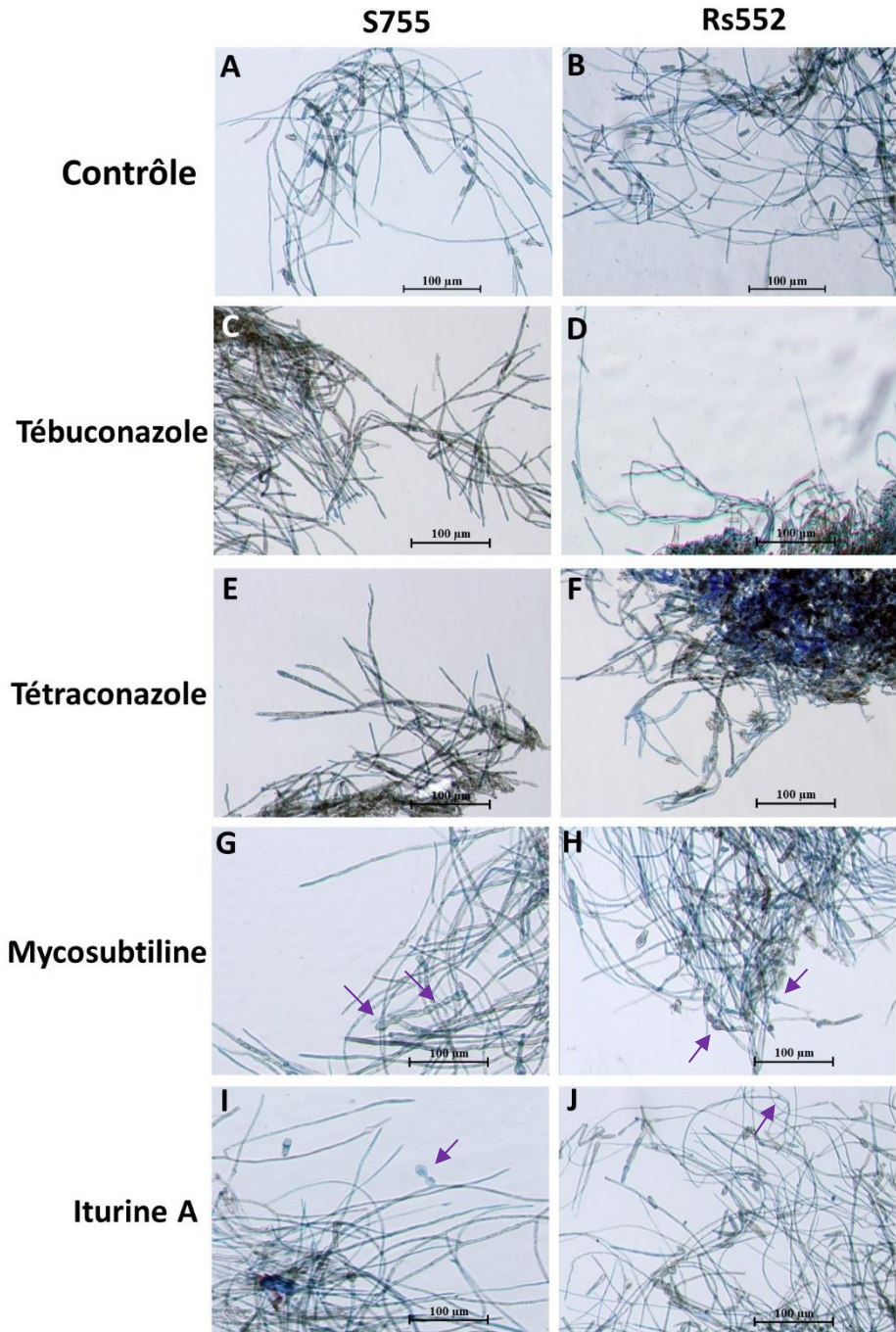


Figure 3-5 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 0,014 mg/L tébuconazole ; D, Rs552 à 0,88 mg/L tébuconazole ; E, S755 à 0,014 mg/L tétraconazole ; F, Rs552 à 0,88 mg/L tétraconazole ; G, S755 à 1,313mg/L mycosubtiline ; H, Rs552 à 1,313 mg/L mycosubtiline ; I, S755 à 2,625 mg/L iturine A ; J, Rs552 à 2,625 mg/L iturine A.

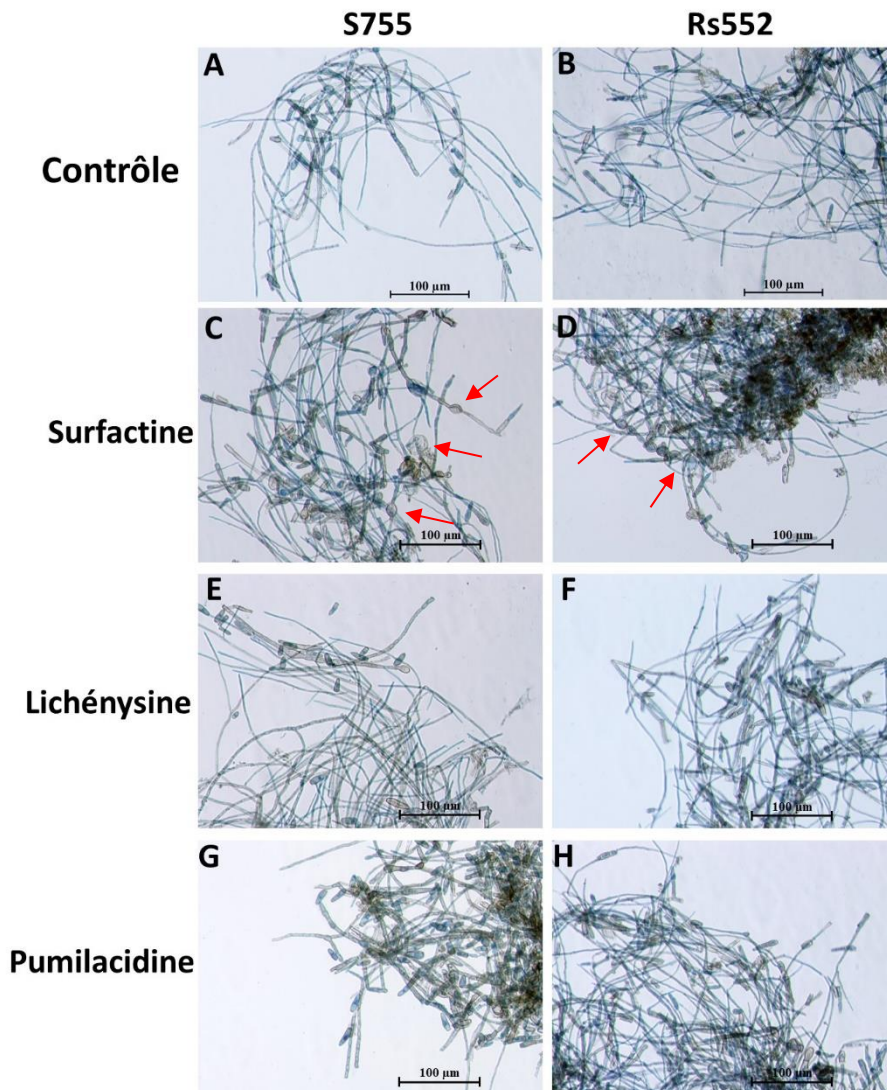


Figure 3-6 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 21 mg/L surfactine ; D, Rs552 à 21 mg/L surfactine ; E, S755 à 42 mg/L lichénysine ; F, Rs552 à 42 mg/L lichénysine ; G, S755 à 42 mg/L pumilacidine ; H, Rs552 à 42 mg/L pumilacidine.

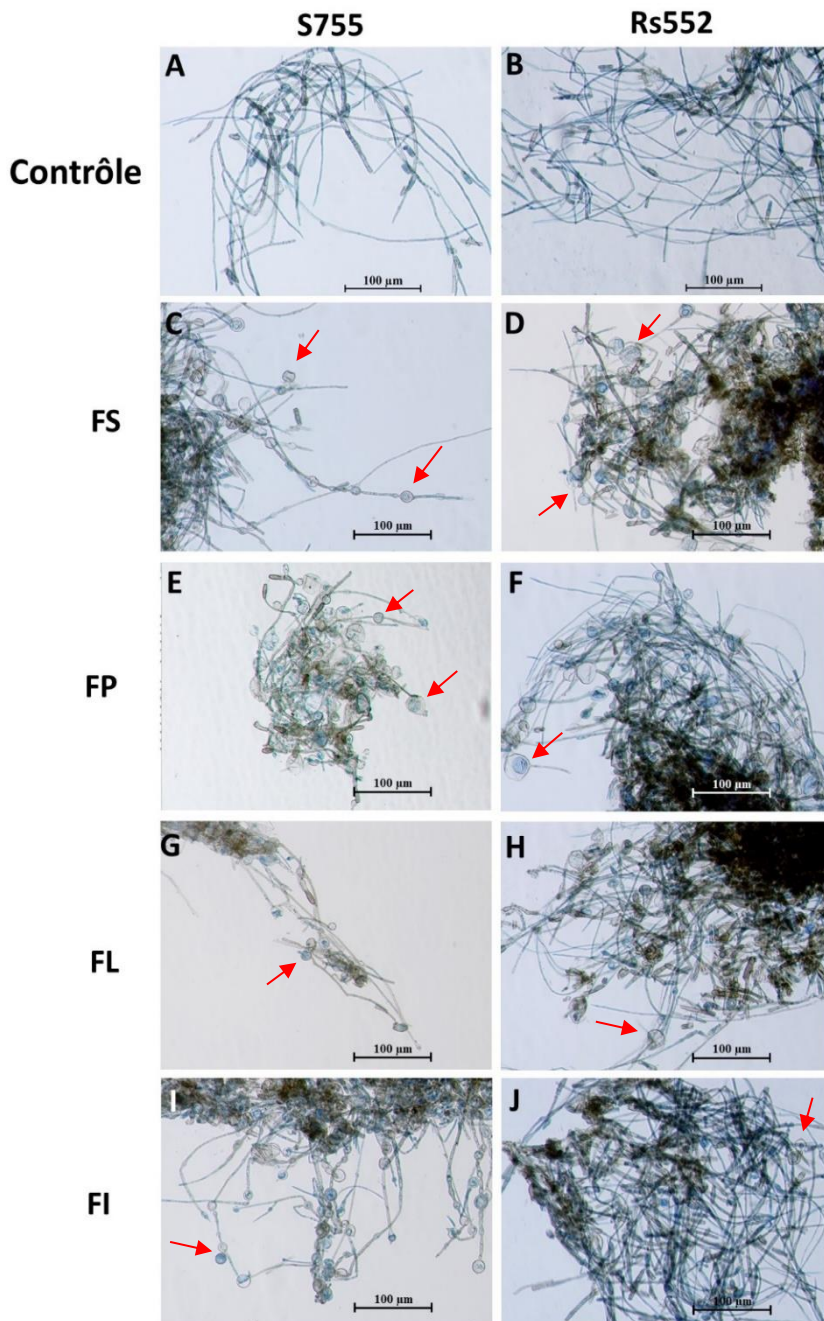


Figure 3-7 : Observations du mycélium des deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552 en microscopie photonique. A, S755 contrôle ; B, Rs552 contrôle ; C, S755 à 0,041 mg/L FS ; D, Rs552 à 42 mg/L FS ; E, S755 à 2,625 mg/L FP ; F, Rs552 à 5,25 mg/L FP ; G, S755 à 1,313 mg/L FL ; H, Rs552 à 10,5 mg/L FL. I, S755 à 0,082 mg/L FI ; J, Rs552 à 1,313 mg/L FI. FS, fengycine-surfactine ; FP, fengycine-pumilacidine ; FL, fengycine-lichénysine ; FI, fengycine-iturine A.

Tableau 3-2 : Effets de l’augmentation de la concentration de lipopeptide sur la présence ou l’absence de sphérules chez les deux souches de *V. inaequalis*.

		Concentrations (mg/L)												
Produits	Souches	0,003	0,005	0,021	0,041	0,082	0,328	0,656	1,313	2,625	5,25	10,5	21	42
Contrôle	Rs552	Absence de sphérules												
	S755	Absence de sphérules												
Fengycine	Rs552	-												+
	S755	-	+	++				++++						
Surfactine	Rs552							-					+	
	S755					-					++			
FI	Rs552					-			+					
	S755	-				+++			++++					
FS	Rs552	-											++	+++
	S755	-			++					+++				
FP	Rs552						+				++			
	S755	-			+++					+++				
FL	Rs552						+					++		+++
	S755	-						++++						

5.3. Analyse quantitative des stérols totaux

Les stérols ont été analysés et quantifiés à partir du mycélium des souches de *V. inaequalis*. Plusieurs stérols ont été identifiés : ergosta-5,8-diène-3-ol, ergosta-7,22-diène-3-ol et ergosta-5,24-diène-3-ol. Le précurseur des stérols dans la voie de biosynthèse des stérols, le squalène, a également été identifié. La quantification des stérols a révélé qu'il n'y avait pas de différence quantitative pour chacun des stérols identifiés ni dans la somme des stérols (Figure 3-8). Les souches ont la même quantité totale de stérols : S755 = 6,20 ± 0,62 µg stérol/mg de poids sec et Rs552 = 6,27 ± 0,71µg stérol/mg de poids sec. De même pour le squalène, aucune différence quantitative n’a été identifiée. Dans l’article, seul l’ergosta-7,22-dien-3-ol montre une

différence significative dans la composition relative avec une plus grande proportion chez Rs552 que chez S755.

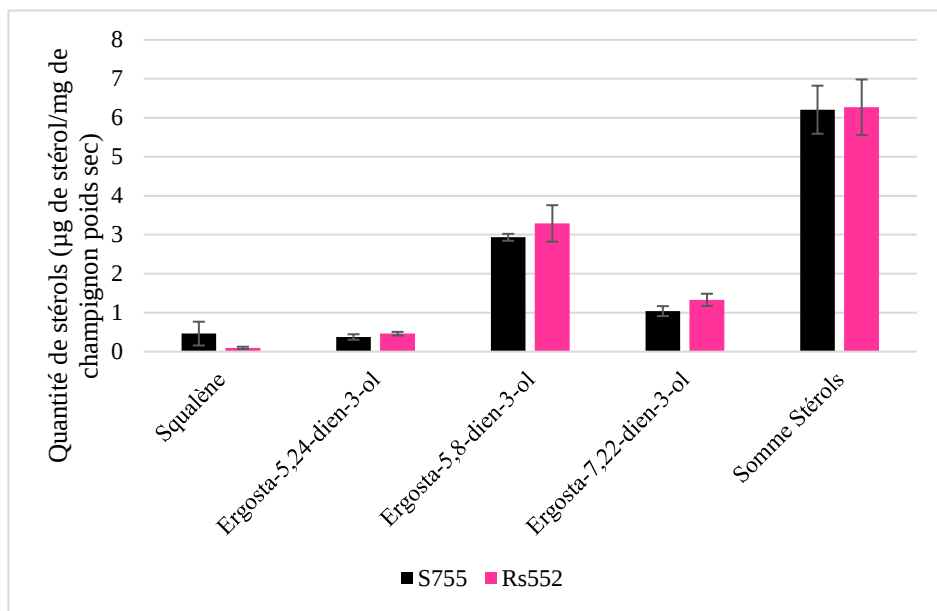


Figure 3-8 : Comparaison de la quantité des différents types de stérols chez les deux souches S755 et Rs552 de *V. inaequalis*. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. L'absence de lettre indique l'absence de différence significative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$.

5.4. Analyse quantitative et qualitative des acides gras totaux

5.4.1. Analyse quantitative

Une analyse par GC-MS a permis d'analyser les acides gras totaux des souches de *V. inaequalis*. Différents acides gras ont été observés : C16 :0, C18 :0, C18 :1 et C18 :2. Grâce au standard interne, les quantités ont été déterminées. Des différences quantitatives existent pour les acides gras C16 :0 et C18 :1 uniquement. La souche S755 contient deux fois plus de C16 :0 et C18 :1 (respectivement, $6,21 \pm 0,6$ µg AG/mg de poids sec et $11,78 \pm 1,45$ µg AG/mg de poids sec) que la souche Rs552 (respectivement, $3,2 \pm 0,07$ µg AG/mg de poids sec et $6,3 \pm 0,34$ µg AG/mg de poids sec) (Figure 3-9A). Les souches ont la même quantité d'acides gras totaux : S755 = $27 \pm 2,27$ µg AG/mg de poids sec et Rs552 = $17,93 \pm 1,24$ µg AG/mg de poids sec (Figure 3-9A).

5.4.2. Analyse qualitative

L'analyse de la composition relative a montré des différences pour tous les acides gras analysés sauf pour l'acide stéarique (C18 :0) (Figure 3-9B). La souche S755 a un pourcentage plus élevé de C16 :0 et C18 :1 (respectivement, $22,96\% \pm 0,39$ et $43,64\% \pm 1,70$) que chez Rs552 (respectivement, $17,93\% \pm 0,92$ et $35,24\% \pm 0,69$). Cette tendance est inversée pour l'acide gras C18 :2 avec $23,35\% \pm 2,01$ pour S755 et $37,08\% \pm 1,68$ pour Rs552 (Figure 3-9B).

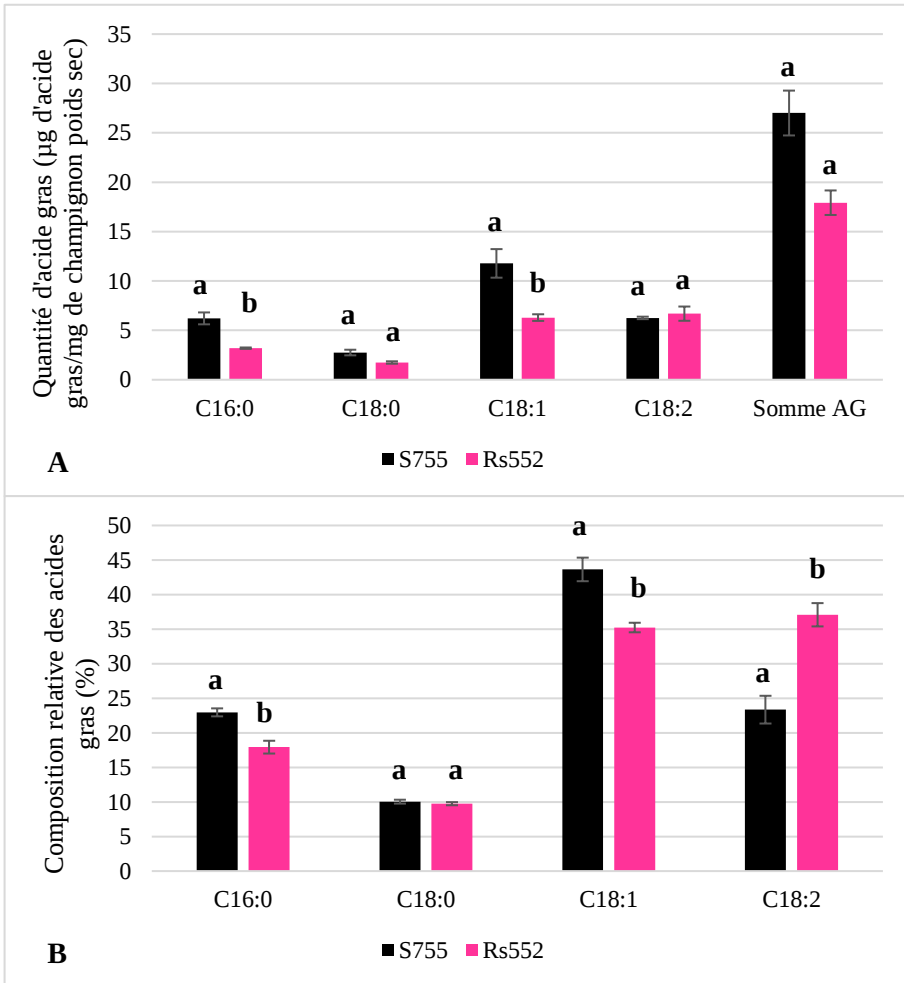


Figure 3-9 : Comparaison de la quantité (A) et de la composition relative (%) (B) des acides gras totaux chez les deux souches S755 et Rs552 de *V. inaequalis*. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence de lettres indique une différence significative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$.

5.5. Analyse quantitative des phospholipides totaux

L'analyse des phospholipides a permis d'identifier et de quantifier les différentes classes de phospholipides et leurs chaînes d'acides gras associées dans les deux souches. La composition quantitative des classes de phospholipides a montré que les deux souches contiennent principalement du phosphatidylinositol (PI), de la phosphatidyléthanolamine (PE) et de la phosphatidylcholine (PC) (Figure 3-10). Les concentrations en PI, PE et PC sont respectivement de $44,69 \pm 5,56 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec, $32,11 \pm 4,49 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec et $12,53 \pm 1,28 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec pour la souche S755 et de $48,86 \pm 18,22 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec, $33,20 \pm 4,24 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec et $12,05 \pm 2,05 \mu\text{g} / \text{mg}$ de poids sec pour la souche Rs552 (Figure 3-10). Aucune différence significative quantitative n'a été notée entre les deux souches pour chaque classe de phospholipides (Annexes 3 et 4). Ce résultat est similaire au résultat présenté dans l'article, aucune différence significative qualitative entre les deux souches.

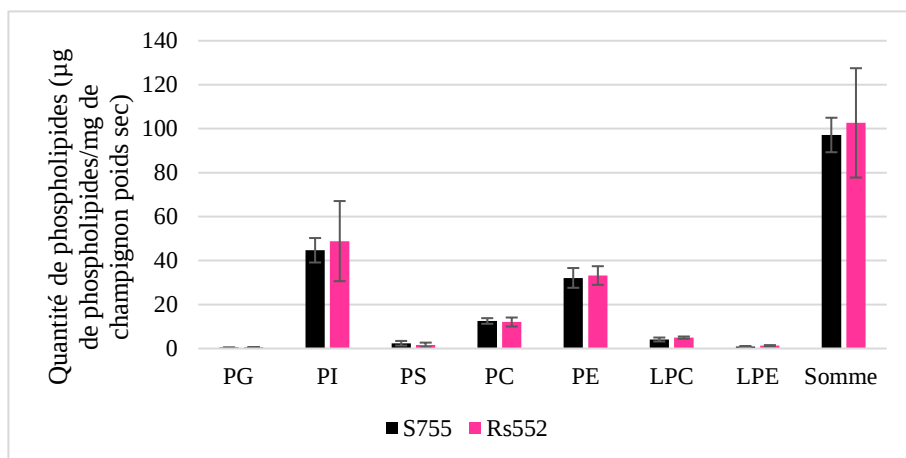


Figure 3-10 : Comparaison de la quantité de chaque classe de phospholipides totaux chez les deux souches de *V. inaequalis*. Phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidyléthanolamine (PE) et lysophosphatidyléthanolamine (LPE). Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. L'absence de lettres indique l'absence d'une différence significative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$.

Au sein de chaque classe de phospholipides, les acides gras ont été déterminés et analysés. Les classes de phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE) n'ont révélé aucune différence entre les deux souches (Annexe 3). Cependant, parmi les classes PC, LPC et LPE, quelques différences ont été observées (Figure 3-11). Le PC C18 :1/C18 :3 est présent en quantités moins élevées chez la souche Rs552 que chez S755 (Figure 3-11A). Pour LPC, les types mineurs LPC C16:0 et LPC C18:0 sont présents dans des quantités plus importantes chez Rs552 (Figure 3-11B). Pour LPE, seul le type mineur LPE C16 :0 est présent en

quantité plus importante chez Rs552 (Figure 3-11C). Il n'y a aucune différence concernant PI (Figure 3-11D). Ces légères différences dans les quantités de phospholipides pourraient cependant affecter les propriétés de la membrane plasmique des souches. Quelques différences significatives ont également été observées pour les compositions relatives. Ces différences montrent davantage de LPC(16 :0), LCP(C18 :0 et LPE(C16 :0) chez la souche Rs552 que chez la souche S755, mais aussi davantage de LPE(C18 :1) et PI(C16 :0/C18 :1) chez la souche S755 que chez la souche Rs552.

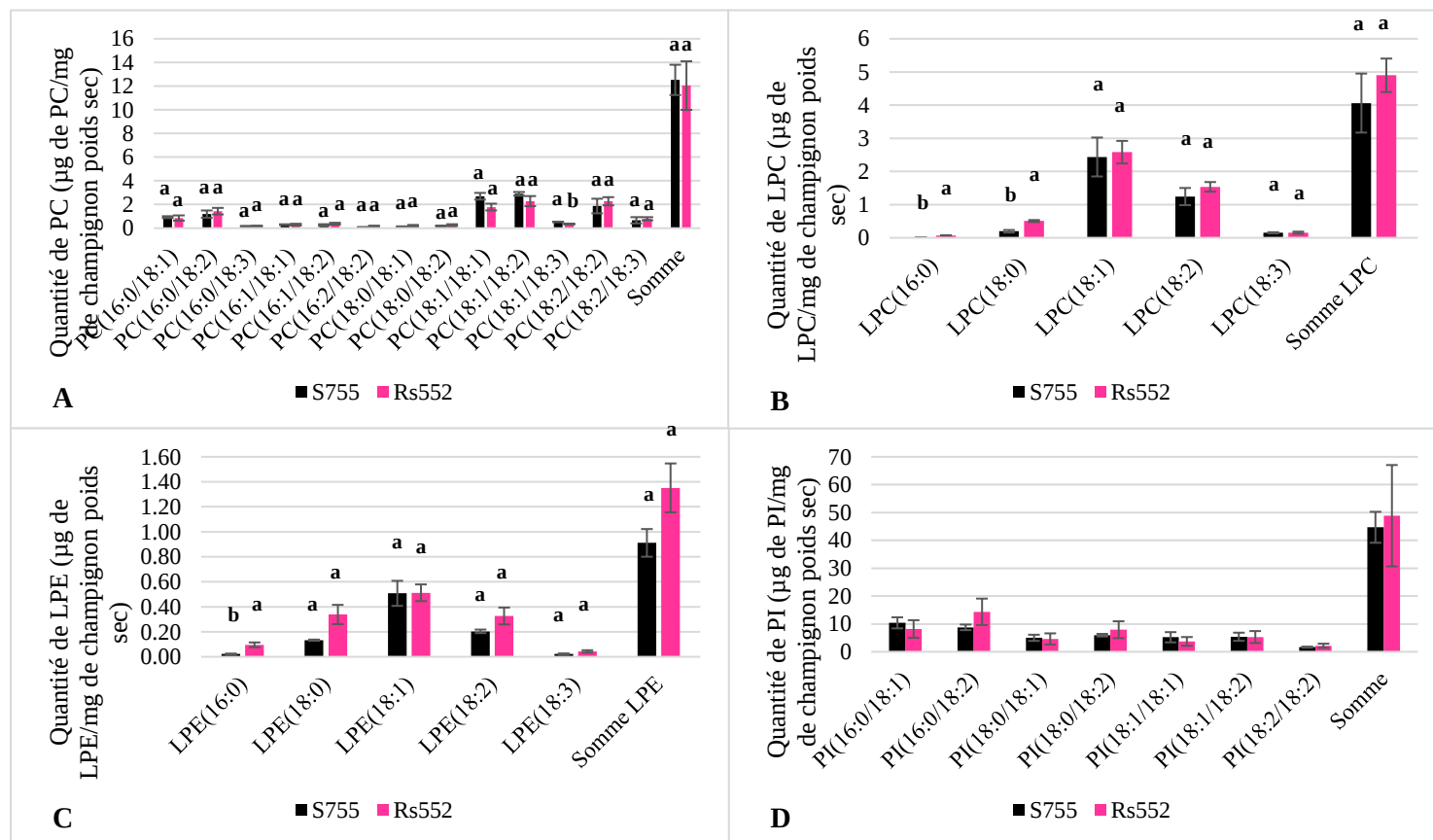


Figure 3-11 : Comparaison de la composition quantitative des phospholipides totaux dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, Comparaison de la composition quantitative du phosphatidylcholine (PC). B, Comparaison de la composition quantitative du lysophosphatidylcholine (LPC). C, Comparaison de la composition quantitative du lysophosphatidyléthanolamine (LPE). D, Comparaison de la composition quantitative du phosphatidylinositol (PI). Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence ou l'absence de lettres indique une différence significative ou non entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$.

5.6. Analyse quantitative et qualitative des triglycérides par LC-MS

Les triglycérides (TG) ont été analysés par LC-MS chez les deux souches. Cette analyse a permis d'obtenir un grand nombre de TG différents dont 14 majoritaires ont été analysés.

Les résultats quantitatifs n'ont montré aucune différence entre les deux souches pour les 14 TG majoritaires et pour la somme des TG : $152,64 \pm 21,56$ $\mu\text{g TG/mg}$ de poids sec pour S755 et $147 \pm 28,21$ $\mu\text{g TG/mg}$ de poids sec pour Rs552 (Figure 3-12A). L'analyse qualitative a, quant à elle, montré des différences entre les deux souches pour les TG 50 :1, 52 :1, 54 :1 et 54 :7 (Figure 3-12B). Les TG 50 :1, 52 :1 et 54 :1 sont en pourcentage significativement plus élevés chez la souche S755 (respectivement, $5,64\% \pm 0,14$, $5,5\% \pm 0,37$ et $1,75\% \pm 0,03$) que chez la souche Rs552 (respectivement, $2,7\% \pm 0,31$, $2,81\% \pm 0,29$ et $0,94\% \pm 0,21$) (Annexe 3). La souche Rs552 en présente un pourcentage significativement plus élevé de TG 54 :7 que la souche S755 (respectivement, $2,53\% \pm 0,19$ et $1,37\% \pm 0,25$) (Annexe 3).

Une analyse plus précise par chaîne d'acides gras a été réalisée. C'est une analyse des chaînes d'acides gras les plus présents sur l'ensemble des triglycérides. Cette analyse a permis d'identifier les chaînes majoritairement présentes : C16 :0, C18 :0, C18 :1, C18 :2 et C18 :3 (Figure 3-13A et B). La quantité et le pourcentage les plus élevées étaient C18 :1 (S755 = $52,95$ $\mu\text{g TG/mg}$ de poids sec $\pm 9,25$ et $37,42\% \pm 2$; Rs552 = $45,23$ $\mu\text{g TG/mg}$ de poids sec $\pm 8,08$ et $33,16\% \pm 0,84$) suivi de C18 :2, C16 :0, C18 :0 et enfin C18 :3 (Annexe 3). Aucune différence n'a été déterminée par l'analyse statistique sauf pour le C18 :2 en relatif. Il est présent en pourcentage plus élevé chez Rs552 avec $29,39\% \pm 0,6$ par rapport à S755 avec $21,17\% \pm 1,19$ (Annexe 3).

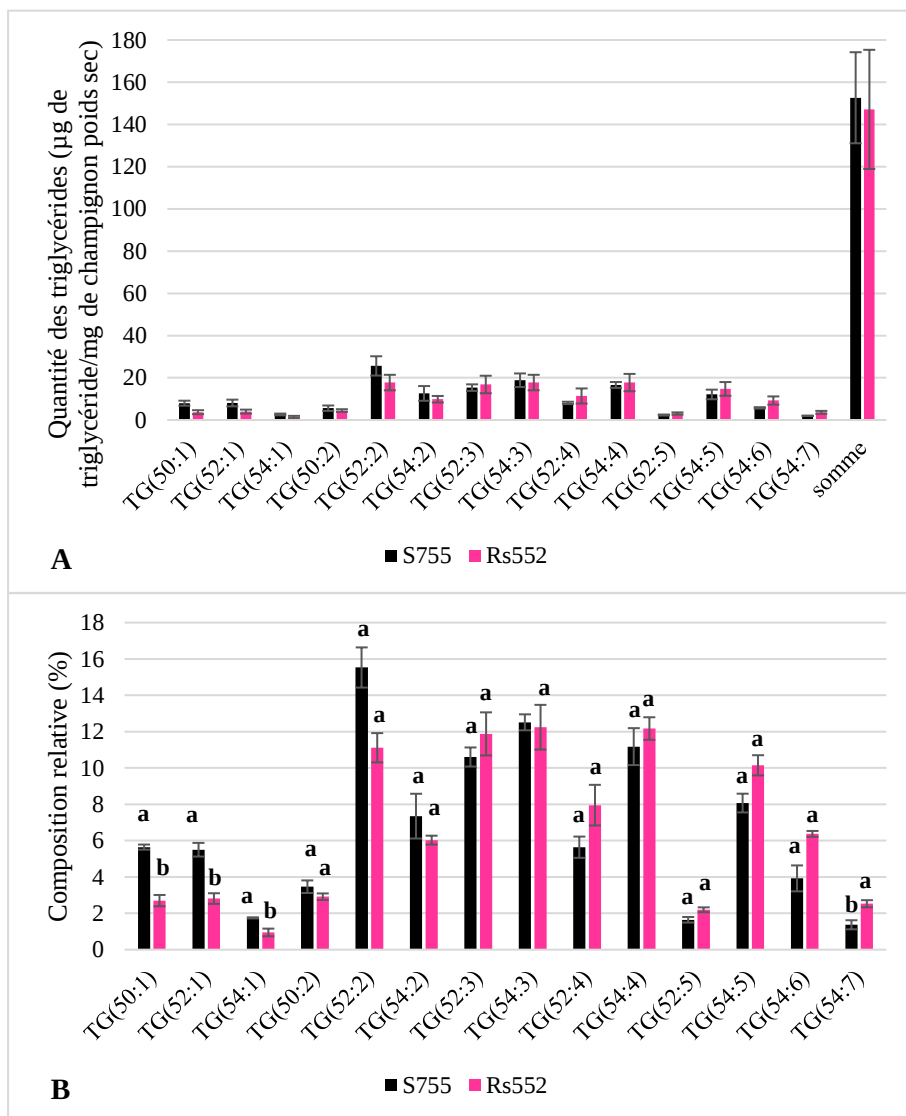


Figure 3-12 : Comparaison de la quantité et de la composition relative (%) des triglycérides (TG) dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, Comparaison de la composition quantitative TG totaux. B, Comparaison de la composition relative (%) des TG totaux. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence ou l'absence de lettres indique une différence significative ou non entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$: $n = 3$.

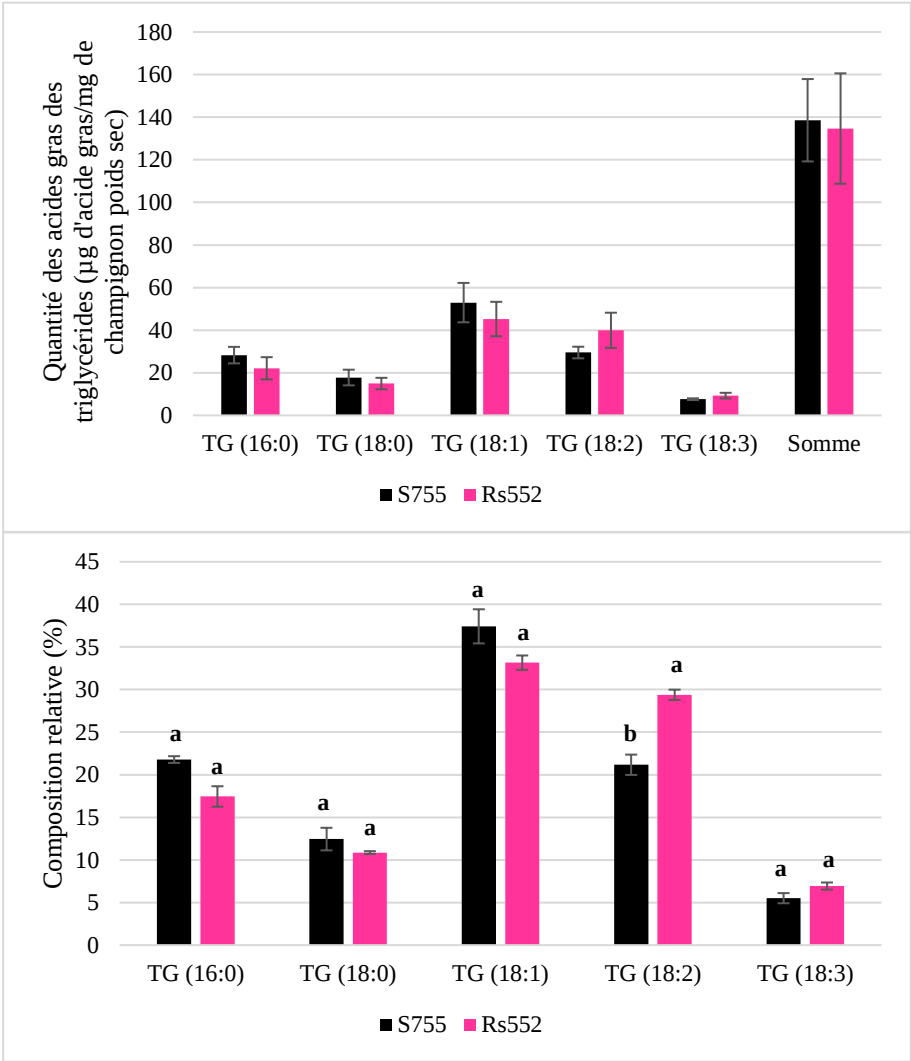


Figure 3-13 : Comparaison de la composition quantitative et relative des triglycérides (TG) pour une chaîne d'acide gras dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, Comparaison de la composition quantitative TG. B,

Comparaison de la composition relative des TG. Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. La présence ou l'absence de lettres indique une différence significative ou non entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$.

6. Discussion

6.1. Activités antifongiques in vitro au sein d'une même famille lipopeptidique

Les tests d'activité antifongique ont montré des efficacités variables des azoles et des lipopeptides vis-à-vis des deux souches de *V. inaequalis*, S755 et Rs552. Cela a été longuement discuté dans l'article précédent. Les activités antifongiques des lipopeptides sont variées. Il est intéressant de noter que nous avons révélé ici que la lichénysine et la pumilacidine (appartenant à la famille des surfactines) ne montrent pas d'activité antifongique contre *V. inaequalis*. Cependant la surfactine présente une activité antifongique contre les deux souches. Il est important de noter cette différence d'activité antifongique au sein de la famille des surfactines. Quelques activités antifongiques de la surfactine ont été rapportées contre *Fusarium moniliforme*, *Fusarium verticillioides* ou encore *Aspergillus flavus* (Farzaneh *et al.*, 2016; Krishnan *et al.*, 2019; Snook *et al.*, 2009). Cependant, l'activité antifongique de la lichénysine et la pumilacidine n'est pas documentée. Les différences structurales entre ces trois molécules ne permettent pas d'expliquer simplement pourquoi il y a une activité antifongique de la surfactine et pas pour la lichénysine et la pumilacidine. En effet, la surfactine et la pumilacidine ont deux acides aminés pouvant être chargés négativement alors que la lichénysine en a un seul. La charge seule ne peut donc pas expliquer cette différence d'activité. L'autre différence structurale se situe au niveau des acides aminés hydrophobes. La pumilacidine a principalement des leucines dans sa structure alors que la surfactine peut contenir de la valine (voire de l'alanine) et donc une chaîne légèrement moins hydrophobe (Jacques, 2011). Ces différents niveaux d'hydrophobicité peuvent moduler l'interaction du lipopeptide avec le champignon. De telles différences d'activités entre ces trois molécules ont été récemment démontré dans le cadre de la thèse de Jéléna Prsic (2024) pour des activités inductrices des mécanismes de résistance chez les plantes. Les activités de l'iturine A et de la mycosubtiline sont différentes par rapport aux activités des surfactines. En effet, les deux lipopeptides ont une activité antifongique contre les deux souches, avec la mycosubtiline ayant une plus forte activité que l'iturine A. Comme discuté dans l'article 2, chapitre 3, les lipopeptides de la famille des iturines sont connus pour leurs activités antifongiques (Liu *et al.*, 2014; Mejri *et al.*, 2018). La différence d'activité entre les deux lipopeptides ne s'explique pas par la charge car ils sont tous les deux neutres. L'hydrophobicité des acides aminés composant le peptide n'influence pas non plus car ce sont les mêmes acides aminés avec une inversion de deux acides aminés en position 6 et 7. La partie peptidique présente un fort caractère hydrophile. Ce qui peut expliquer la différence d'activité est la longueur de la chaîne d'acide gras du lipopeptide (plutôt C14 et C15 pour l'iturine A contre C16 et C17 pour la mycosubtiline). En effet, la longueur de la chaîne va influencer sur le caractère amphiphile de la molécule et donc sur l'activité des lipopeptides. Cela a été démontré pour la mycosubtiline où une chaîne d'acide gras plus longue a une meilleure activité antifongique (Béchet *et al.*, 2013; Guez *et al.*, 2022). La bioactivité dépendante de la famille de lipopeptides contre *V. inaequalis* est probablement due aux variations de

structure dans la partie peptidique et dans les longueurs de chaînes d'acides gras, qui sont plus marquées au niveau inter-familles qu'au niveau intra-famille (Deleu *et al.*, 2013; Francius *et al.*, 2008; Jacques, 2011).

6.2. Observation des sphérules par microscopie

Les résultats présentés dans l'article précédent ont permis de constater que la fengycine a induit des changements morphologiques et la formation de vésicules dans le mycélium des deux souches, mais avec une occurrence moindre chez Rs552. La fengycine n'a pas été le seul lipopeptide formant des vésicules chez les deux souches de *V. inaequalis*. Nos résultats complémentaires, suggèrent également que la surfactine induit également cette modification structurale chez ce champignon avec une occurrence moindre chez Rs552. Ce phénomène a également été reporté chez *Colletotrichum gloeosporioides* (Park *et al.*, 2019) et *Fusarium foetens* (Liu *et al.*, 2023) en présence de surfactine. La pumilacidine et la lichénysine n'ont pas induit de modifications morphologiques chez *V. inaequalis*. Cela pourrait coïncider avec leur absence d'activité contre les deux souches. Néanmoins, cela peut être contradictoire avec l'absence d'activité de la fengycine mais la présence de sphérules chez Rs552. La présence de sphérules étant faible à haute concentration chez Rs552 comparé à S755, laisse suggérer que l'apparition de sphérules est dépendant de la concentration de la fengycine et de la surfactine. De plus, les résultats complémentaires montrent la présence de sphérules pour tous les mélanges binaires et contre les deux souches. La présence des sphérules est également dépendante de la concentration. Très peu de sphérules sont observées en présence de fengycine contre Rs552. Les mélanges FL et FP montrent un nombre plus important de sphérules pour la souche Rs552 que lors des observations de la fengycine seule. Toutefois, la mycosubtiline et l'iturine A, qui présentent une activité antifongique, ne semblent pas induire la formation de sphérules également, laissant entrevoir un mode d'action différent entre les familles des fengycines et des iturines. L'ensemble des résultats concernant les activités antifongiques et les observations microscopiques a permis de montrer une action différente entre la fengycine et la surfactine d'une part, et la mycosubtiline et l'iturine A d'autre part. Les apparitions de sphérules sont dépendantes non seulement du lipopeptide testé et de sa famille, de la souche utilisée mais aussi de la concentration en lipopeptides. Les lipopeptides sont connus pour leurs interactions avec les lipides membranaires. La fengycine va d'abord former des agrégats entre elles pour ensuite interagir en profondeur avec les lipides membranaires par ancrage et/ou formation de pores (Deleu *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2011; Zakharova *et al.*, 2019). Ces phénomènes vont permettre la perturbation de la membrane puis la fuite membranaire entraînant la mort cellulaire. Les iturines vont altérer la perméabilité de la membrane ce qui va former des pores ioniques (Aranda *et al.*, 2005; Zakharova *et al.*, 2019). La formation de ces pores va entraîner la fuite membranaire et ensuite la mort cellulaire. Les surfactines n'ont pas un effet antifongique aussi marqué que les fengycines ou les iturines. L'hydrophobicité des chaînes d'acides gras permettent, aux fengycines ou aux iturines, une bonne interaction avec les lipides (Deleu *et al.*, 2013,

2003; Francius *et al.*, 2008). Ces interactions sont liées à leur capacité d'auto-association (Deleu *et al.*, 2003). Ces informations indiquent l'importance des lipides dans l'interaction avec les lipopeptides.

6.3. Analyse lipidomique

Il était intéressant de connaître la composition lipidique des deux souches de *V. inaequalis*. L'objectif étant d'apporter une explication à la variabilité de la sensibilité de *V. inaequalis* à la fengycine. Aucune distinction quantitative entre les deux souches n'a été constatée concernant les stérols totaux et les grandes classes de phospholipides et lysophospholipides. Néanmoins, lors de l'analyse affinée des phospholipides et l'analyse des TG et AG certaines différences quantitatives et relatives ont été observées. Notamment l'ergosta-7,22-dien-3-ol, le LPC(C16:0), le LPC(C18:0), le LPE(16:0), le TG(54 :6) et l'AG C18 :2 où leur présence est plus importante chez la souche Rs552 que chez la souche S755. Pour le PC(18 :1/18 :3), le PI(16:0/18:1), le LPE(C18:1), le TG(50 :1), le TG(52 :1), le TG(54 :1), l'AG C16 :0 et l'AG C18 :1 la tendance inverse est observée. Ces différences pourraient être mises en relation avec la différence de sensibilité obtenue entre S755 et Rs552.

Pour rappel, la membrane plasmique fongique comprend une bicouche lipidique composée de phospholipides, stérols et sphingolipides. Les phospholipides sont des composés prépondérants (Weete, 2012). L'ergostérol, le deuxième composant majeur, régule la fluidité et la perméabilité membranaire (Deacon, 2006; Pan *et al.*, 2018; Stephenson, 2010). Les lipides chargés négativement (PG, PI et PS), les acides gras insaturés à chaîne courte (phospholipides) et une faible concentration d'ergostérol jouent un rôle clé dans la fluidité membranaire, favorisant ainsi l'interaction entre la fengycine et les membranes plasmiques fongiques (Mantil *et al.*, 2019; Wise *et al.*, 2014; Zakharova *et al.*, 2019). Dans le cas de nos souches, les différences qualitatives et quantitatives observées montrent qu'il y a plus d'ergosta-7,22-dien-3-ol, moins de PI (lipides chargés négativement) et moins d'insaturations chez la souche Rs552. La longueur de chaîne des acides gras est principalement C16 ou C18. Il est difficile de dire si ce point joue un rôle dans la différence de sensibilité entre les souches. L'ensemble des éléments correspond aux caractères pouvant limiter l'interaction de la fengycine avec *V. inaequalis*.

Les acides gras sont des lipides importants dans la composition lipidique de par leur présence dans les phospholipides et les sphingolipides (Harayama and Riezman, 2018). De plus, ils peuvent être retrouvés en tant que lipides de réserve sous forme de mono, di ou tri-glycérides. L'analyse des acides gras totaux ont montré des différences entre S755 et Rs552 pour le C16 :0, le C18 :1 et le C18 :2. Ces différences pourraient être corrélées avec les différences observées dans les chaînes des phospholipides. De plus, la présence plus élevée de C18 :2 chez la souche Rs552 pourrait correspondre à une présence plus élevée de C18 :2 parmi les TG. Les TG sont principalement utilisés comme principale source de carbone pour le fonctionnement de la cellule (Athenaki *et al.*, 2018). Mais ils peuvent également servir de réserve pour réparer la membrane.

Botcazon *et al.*, (2022) suggèrent que la présence de lipides de réserve peut aussi permettre de se défendre face à une toxicité de la fengycine. Botcazon *et al.*, (2022) suggèrent qu'une souche résistante aurait plus de TG pour se défendre. Ce qui n'est pas le cas entre nos deux souches de *V. inaequalis* car la somme des TG ne montre pas de différence entre nos deux souches.

7. Conclusion

Les résultats de ce chapitre montrent que la sensibilité réduite de Rs552 au tébuconazole est due à une surexpression du gène *Cyp51A* causée par deux insertions dans la région promotrice, probablement couplée à un efflux plus important des pompes MFS et ABC. Nous avons démontré, grâce à une analyse génomique avancée, que cette surexpression de *Cyp51A* dans la souche résistante est le résultat d'une différence dans la structure de la région promotrice qui peut affecter la liaison de facteurs de transcription spécifiques. D'autre part, la fengycine n'a aucun effet sur l'expression du gène *Cyp51A*, tout comme les résultats en présence de MPE n'ont montré aucune synergie. Cependant, il est compliqué de conclure sur un lien entre la sensibilité réduite aux triazoles et la résistance à la fengycine. En effet, la surexpression n'est pas induite par le tébuconazole ni par la fengycine. De plus, la fengycine ne présente aucune synergie en présence de MPE alors que le tébuconazole oui. Cela suggère que le tébuconazole entre dans la cellule alors qu'il est probable que la fengycine n'entre pas. La résistance à la fengycine est très probablement due à un autre mécanisme d'action.

De plus, il a été mis en évidence que l'activité des iturines contre *V. inaequalis* dépend de la famille des molécules plutôt que de leur structure intrafamiliale, alors que c'est le cas inverse pour la famille des surfactines. Ce résultat ainsi que l'activité différenciée de la fengycine sur les souches de *V. inaequalis* ont guidé nos recherches vers la compréhension du mode d'action de la fengycine. De nouvelles connaissances sur les mécanismes liés à la sensibilité réduite aux lipopeptides chez *V. inaequalis* ont été obtenues. La sensibilité réduite à la fengycine pourrait être associée à des changements dans la composition en lipides fongiques (stérols, phospholipides, TG et acides gras) qui peuvent affecter la fluidité de la membrane et la formation de complexes protéiques permettant la signalisation intracellulaire, mais aussi influencer une plus faible formation de sphérules au sein du mycélium fongique de Rs552. Ces résultats suggèrent de se concentrer sur les familles les plus prometteuses (fengycines et iturines) dans la recherche future de nouveaux fongicides ayant une meilleure activité contre le phytopathogène.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Certains résultats dans l'analyse lipidique montrent une tendance à être différents mais l'analyse statistique ne le montre pas. Il faudrait refaire ces analyses pour affiner les résultats et pouvoir observer si les différences obtenues restent significatives mais aussi si de nouvelles sont détectées. Il pourrait être intéressant également d'analyser la composition membranaire des souches après le contact avec la fengycine, afin de permettre de voir,

si la composition change au contact de la fengycine. Enfin, une dernière idée serait de doser la fengycine ou d'autres lipopeptides dans les puits lors de l'activité antifongique pour mettre en évidence si les lipopeptides sont dégradés. En effet, *V. inaequalis* pourrait produire des enzymes permettant la dégradation des lipopeptides. Il se pourrait également que le milieu de culture change de pH, que les lipopeptides ne tolèrent pas ce changement et se dégradent ou précipitent. Ces pistes de recherches sont des idées pour améliorer nos résultats mais aussi pour améliorer notre compréhension de l'utilisation des lipopeptides.

Il avait été aussi prévu d'investiguer l'interaction des fengycines sur des membranes biomimétiques. Cela aurait permis de définir un mode d'action plus précis qu'actuellement. Néanmoins, l'extraction des membranes plasmiques des champignons n'est pas facile et elle est très chronophage du fait du temps de culture long de *V. inaequalis*. Les essais préliminaires effectués dans ce sens n'ont pas permis d'obtenir la composition lipidique membranaire des souches de *V. inaequalis*. Ces essais ont été arrêtés, mais les premiers résultats obtenus permettent de définir les étapes importantes du protocole d'extraction qui servira pour de futures expériences. Ces membranes artificielles auraient permis d'étudier l'interaction de la fengycine et éventuellement d'autres lipopeptides avec celles-ci. S'il existe une différence dans la composition lipidique membranaire des deux souches, cela permettrait de savoir si ce sont les lipides membranaires qui sont la cause de la différence de sensibilité entre les deux souches.

Chapitre 4

Discussion Générale

La tavelure, causée par le champignon *V. inaequalis*, est l'un des principaux défis pour les producteurs de pommes. Pour lutter contre la tavelure, diverses méthodes agronomiques sont utilisées comme la prophylaxie ou la lutte chimique en agriculture conventionnelle. La lutte chimique reste une méthode courante pour contrôler la tavelure, mais l'utilisation répétée des fongicides chimiques systémiques tels que ceux de la famille des triazoles a engendré l'apparition de cas de résistance. En agriculture biologique, l'utilisation de fongicides minéraux de contact comme les fongicides cuivriques peut entraîner des problèmes d'écotoxicité environnementale (Andriveau *et al.*, 2017). Face à l'emploi des fongicides chimiques et des fongicides cuivriques, l'utilisation de biopesticides, notamment les lipopeptides de *Bacillus*, apparaît comme une alternative prometteuse non seulement dans le cadre de la protection fruitière intégrée en agriculture conventionnelle mais aussi dans le cadre de la protection biologique en agriculture biologique. Cependant, de nombreuses hypothèses restent à démontrer concernant les mécanismes d'action des lipopeptides. Dans notre cas particulier, par exemple, sur le mode d'action des différentes familles de lipopeptides sur la membrane du champignon (Chapitre 1, partie 4 page 22). Cela souligne la nécessité de recherches approfondies dans ce domaine.

Dans le cadre de la mise en œuvre de solutions biologiques pour lutter contre *V. inaequalis*, plusieurs objectifs ont été déterminés pour ces travaux de thèse. Le premier a été d'investiguer si les lipopeptides d'une même famille ont le même mode d'action. Un second objectif a été d'évaluer l'activité *in vitro* et *in vivo* de mélanges lipopeptidiques et de leurs effets synergiques ou non pour lutter contre ce pathogène. Pour ces objectifs, des expériences permettant de déterminer des concentrations inhibitrices médiane *in vitro* et des tests en vergers ont été effectués. Un dernier objectif a été de comprendre les mécanismes d'action des triazoles et des lipopeptides contre deux souches de *V. inaequalis*. Ces souches ont des sensibilités différentes au tébuconazole : une souche sensible (S755) et une souche à sensibilité réduite (Rs552). Pour cela, nous avons exploré différentes hypothèses au niveau génétique et moléculaire, au niveau de l'efflux des molécules et au niveau de la composition membranaire des champignons (combinaison de la lipidomique et la microscopie). Ces objectifs correspondent aux thématiques de l'équipe 4 « Métabolites secondaires d'origine microbienne » et de l'équipe 5 « Métabolites spécialisées d'origine végétale » de l'UMRt BioEcoAgro, dont l'un des objectifs est de proposer une alternative aux intrants chimiques par des molécules biosourcées pour lutter contre les phytopathogènes.

1. Effet des lipopeptides seuls *in vitro*

L'activité de six lipopeptides (fengycine, iturine A, mycosubtiline, surfactine, pumilacidine et lichénysine) et de deux substances actives triazoles (tébuconazole et tétraconazole) a été évaluée en utilisant deux souches de *V. inaequalis*, S755 et Rs552. La souche S755 est sensible aux triazoles mais aussi à l'ensemble des lipopeptides sauf la lichénysine et la pumilacidine. De plus, la fengycine a une activité antifongique

similaire à celle des triazoles. La souche Rs552 est moins sensible aux triazoles que la souche S755. Pour rappel, le niveau de résistance au tébuconazole et au tétraconazole entre les souches est de 96 et 100. Le niveau de résistance au tébuconazole de ces souches a également été déterminé et il est compris entre 70 et 100 (Desmyttere *et al.*, 2019; Moureu *et al.*, 2023; Muchembled *et al.*, 2018). Contre cette même souche, certains lipopeptides ont une activité antifongique montrant une courbe dose réponse. L'iturine A a une meilleure activité que la mycosubtiline qui elle-même a une meilleure activité que la surfactine. La souche Rs552 est résistante à la fengycine, à la pumilacidine et à la lichénysine. La fengycine est connue pour son activité antifongique contre les champignons filamenteux ou ascomycètes (Vanittanakom *et al.*, 1986; Wise *et al.*, 2014). Son activité a été montrée contre *Verticillium dahliae*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus* ou encore *Fusarium oxysporum* f. sp. *Iridacearum* (FOI) (Farzaneh *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014; Mihalache *et al.*, 2018). La famille des iturines est aussi connue pour sa puissante activité antifongique. Des activités antifongiques de l'iturine A ont été déterminées contre *R. stolonifer*, *V. dahliae* (Liu *et al.*, 2014) et de la mycosubtiline contre de nombreux champignons comme *B. cinerea*, *B. lactucae*, *Z. tritici*, *A. niger* et *V. inaequalis* (Deravel *et al.*, 2014b; Desmyttere *et al.*, 2019; Guez *et al.*, 2022; Mejri *et al.*, 2018). Les lipopeptides de la famille des fengycines et des iturines sont les molécules avec le plus d'activité antifongique (Jacques, 2011). Il est normal que les activités des lipopeptides puissent varier en fonction des pathogènes. Nos résultats montrent que la fengycine est davantage active que la mycosubtiline et l'iturine A contre S755 et c'est l'inverse pour la souche Rs552 chez laquelle la mycosubtiline est plus active. Liu *et al.* (2014) montrent que la fengycine est plus active contre *V. dahliae* que l'iturine A. Mais le phénomène inverse est observé contre *R. stolonifer*. La différence d'activité va dépendre de l'interaction du lipopeptide avec le pathogène ciblé. En effet, les champignons n'ont pas les mêmes caractéristiques au niveau de la paroi et de la membrane. Cela peut donc influencer la différence d'activité des lipopeptides. Il serait intéressant de doser les lipopeptides dans le milieu de culture et/ou dans le champignon pour observer si les lipopeptides entrent dans la cellule ou s'ils sont dégradés.

La famille des surfactines est connue pour son pouvoir surfactant et dans de rares cas pour des activités antifongiques. L'activité antifongique de la surfactine a été documentée contre *F. sambucinum*, *V. dahliae*, *V. inaequalis* ou encore *A. flavus* (Desmyttere *et al.*, 2019; Farzaneh *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014). Récemment l'activité antifongique de la lichénysine a été observée contre *Alternaria alternata* à une concentration inhibitrice minimale de 1,2 mg/mL (Guo *et al.*, 2023). Cependant, à cette concentration c'est un effet détergent qui est observé plutôt qu'une activité antifongique. De plus, il n'y a pas d'autres études réalisées sur la lichénysine ou la pumilacidine comme produits antifongiques. Il est intéressant de noter que dans une étude précédente, la surfactine a été testée contre nos deux souches de *V. inaequalis*. Nos résultats montrent que la souche S755 est sensible à la surfactine avec une CI₅₀ similaire aux résultats de Desmyttere *et al.* (2019). Cependant pour la souche Rs552,

Desmyttere *et al.* (2019) ont montré que la surfactine n'avait pas d'activité antifongique alors que nos résultats présentent une activité antifongique de la surfactine contre Rs552. Ces résultats contradictoires peuvent être surprenants. Lors de l'obtention de ces résultats plusieurs hypothèses ont été posées et vérifiées. La première suggère une contamination du lot de surfactine par un autre lipopeptide ayant une activité antifongique. Après une analyse approfondie des différents lots de production par LC-MS, cette hypothèse a été écartée. La deuxième hypothèse concerne la pureté de la surfactine et l'influence de ces impuretés contre les souches. Cette hypothèse peut être valable car la pureté du lot de surfactine utilisé est de 85%. Donc il y a 15% d'impuretés pouvant influencer notre étude. Les impuretés peuvent être d'autres molécules produites dans le milieu de culture lors de la production des lipopeptides. La dernière hypothèse est la composition des isoformes contenus dans le lot de surfactine. Notre analyse LC-MS a démontré que les lots utilisés par Desmyttere *et al.* (2019) et les nôtres sont différents au niveau des proportions d'isoformes de surfactine, ceci pourrait avoir un effet sur l'activité. Ce type d'activité différenciée des isoformes de lipopeptides est bien documenté pour la famille des iturines (Béchet *et al.*, 2013; Guez *et al.*, 2022), mais aussi dans certains travaux sur la surfactine qui montrent une légère activité antifongique de certains isoformes (Wang *et al.*, 2017). Ces deux dernières hypothèses peuvent être valables et expliquer cette différence de résultats de l'activité antifongique de la surfactine contre Rs552. Si les surfactines ont peu ou pas d'activité contre les champignons dont *V. inaequalis*, elles sont cependant connues pour leurs effets synergiques importants en association avec d'autres lipopeptides (Deravel *et al.*, 2014b; Jacques, 2011; Mejri *et al.*, 2018; Munakata *et al.*, 2022).

2. Effet des mélanges de lipopeptides *in vitro*

Des tests *in vitro* de différents mélanges de lipopeptides ont été effectués afin d'observer des effets synergiques ou non. Les mélanges testés sont composés de fengycine (F) (50%) couplée à un autre lipopeptide (50%), iturine A (I), surfactine (S), pumilacidine (P) ou lichénysine (L). Ces mélanges ont été testés contre la souche sensible et les résultats montrent un niveau d'activité des quatre mélanges similaires à celui de la fengycine seule. Contre la souche de sensibilité réduite au tébuconazole, les niveaux d'activité sont variés. Les mélanges FI et FS ont respectivement une activité antifongique similaire à l'iturine A ou à la surfactine seule. La fengycine, la pumilacidine et la lichénysine seules n'ont pas d'activité antifongique contre Rs552. Or, les mélanges FL ou FP montrent un niveau d'activité plus intéressant que le mélange FS. L'activité de FL et de FP contre Rs552 met en évidence une synergie des lipopeptides. Une synergie a été rapportée en présence de surfactine et de fengycine contre *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (Munakata *et al.*, 2022). En effet, la surfactine n'avait pas d'activité et l'activité antifongique du mélange était plus intéressante que la fengycine seule. Cela a également été observé par Farzaneh *et al.* (2016) contre *A. flavus*, excepté que la fengycine n'a pas d'activité antifongique et la surfactine oui. La fengycine et la surfactine couplées ont une activité plus

intéressante que la surfactine seule. Il existe également des effets synergiques entre les lipopeptides de la famille des fengycines et iturines ou surfactines et iturines. Ces effets synergiques n'ont pas été mis en lumière contre *V. inaequalis*. C'est le cas contre *F. sambucinum* avec un mélange fengycine-iturine (Liu *et al.*, 2014) ou contre FOI et *B. lactucae* avec un mélange mycosubtiline-surfactine (Deravel *et al.*, 2014b; Mihalache *et al.*, 2018). Il est intéressant de constater les effets synergiques des lipopeptides dans le cas de leur production. En effet, pour pouvoir utiliser les lipopeptides en agriculture biologique, il est important d'utiliser des souches naturelles pouvant produire un ou plusieurs lipopeptides. Donc, connaître les effets synergiques des lipopeptides pour utiliser la souche la plus appropriée est essentiel. De plus, il est possible d'orienter la production des lipopeptides pour obtenir des ratios précis de lipopeptides (Coutte *et al.*, 2010; Fahim *et al.*, 2012).

Dans ces travaux de thèse, des mélanges lipopeptidiques avec différents ratios ont été réalisés et testés contre *V. inaequalis*. Ainsi, la fengycine, la mycosubtiline et la surfactine ont été testées seules ou en mélange avec des ratios différents contre la souche sensible S755. Les résultats montrent que 100% de fengycine ou 100% de mycosubtiline ont autant d'activité antifongique que le mélange 50-50% fengycine-surfactine ou 80-20% mycosubtiline-surfactine. Pour faire produire par une souche de *Bacillus* des ratios précis de lipopeptides, il est possible d'orienter son métabolisme. Pour cela, il est possible d'influencer différents paramètres, comme, le pH, la température, la composition du milieu et le transfert d'oxygène (Coutte *et al.*, 2010; Fahim *et al.*, 2012; Jacques, 2011). Après avoir déterminé les meilleurs ratios à utiliser, il a été possible d'orienter la production des mélanges de lipopeptides à partir de souches naturelles de *Bacillus*. La réglementation de l'agriculture biologique permet l'utilisation de ces mélanges. C'est ce qui sera discuté lors de la prochaine partie.

3. Effet des mélanges de lipopeptides *in vivo*

Suite aux résultats précédemment obtenus *in vitro*, des mélanges de lipopeptides ont été retenus pour réaliser des essais en vergers biologiques. Il s'agit des mélanges fengycine-surfactine 55-45% et mycosubtiline-surfactine 80-20%. Le mélange mycosubtiline-surfactine a montré une efficacité significative proche de la référence (Cuivre/Soufre) avec une réduction de 60% de l'incidence de la maladie alors que le mélange fengycine-surfactine n'apporte une protection qu'en cas de faible pression de la maladie. Ces résultats montrent pour la première fois l'activité antifongique *in vivo* des lipopeptides contre *V. inaequalis*. Ce type de mélange a déjà montré son efficacité *in vivo* contre d'autres phytopathogènes tels que *Z. tritici* et *B. lactucae* (Deravel *et al.*, 2014b; Mejri *et al.*, 2018). Dans les deux études, seuls les mélanges MS ont été testés. La première, contre *Z. tritici* montre 80% de réduction de l'incidence de la maladie. La deuxième, contre *B. lactucae*, met en évidence que la mycosubtiline et la surfactine ensemble ont un effet synergique permettant de protéger les plantules. L'ensemble de ces études a permis de confirmer que l'utilisation des

lipopeptides est une solution de lutte efficace. De plus, le choix du ratio permet de contrôler l'apport de tel lipopeptide par rapport à un autre pour utiliser les propriétés de ceux-ci de la meilleure façon. En effet, l'utilisation de la surfactine couplée à de la fengycine ou de la mycosubtiline avec un certain ratio va apporter des avantages. Le premier avantage de la surfactine a déjà été discuté. Il s'agit de la synergie des molécules entre elles contre le phytopathogène (Deravel *et al.*, 2014b; Mihalache *et al.*, 2018; Munakata *et al.*, 2022; Romero *et al.*, 2007). Le second avantage est l'effet de la surfactine sur la stimulation des défenses des plantes (Cawoy *et al.*, 2014).

En effet, en plus d'avoir une activité antifongique synergique ou non, les lipopeptides peuvent avoir un effet sur la stimulation des défenses des plantes. Cela n'a pas été étudié dans ces travaux de thèse, mais cela reste un axe de recherche important. Il a été montré que la surfactine stimule la résistance systémique induite chez les plants de tabac, de tomate ou de blé (Cawoy *et al.*, 2014; Le Mire *et al.*, 2018; Ongena and Jacques, 2008; Pršić and Ongena, 2020). Il a également été récemment décrit que la mycosubtiline amorce des mécanismes liés à la défense de la plante chez le blé. Chez cette plante, une analyse par transcriptomique a permis d'observer que la mycosubtiline déclenche 80 gènes liés aux premiers stades d'une l'infection par *Z. tritici* (Platel *et al.*, 2023). Il peut être envisagé que la mycosubtiline et/ou la surfactine puissent donc avoir des effets similaires lors d'applications sur pommiers.

L'utilisation des lipopeptides en verger est prometteuse car ils ont montré une réduction de la maladie au même niveau que le cuivre utilisé classiquement. L'utilisation du cuivre est de plus en plus controversée, due à la pollution des eaux et des sols (Andrivon *et al.*, 2017). C'est dans le cadre du développement des produits de biocontrôle qu'une cinquantaine de produits à base de *Bacillus* ont été homologués, néanmoins, aucun à partir de lipopeptides purs comme nous l'avons testé. C'est produits font partie d'une liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle au titre des articles L.253-5 et L-253-7 du code rural et de la pêche maritime (Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire *et al.*, 2023). Pour envisager l'utilisation des lipopeptides en tant qu'antifongique, plusieurs points doivent encore être améliorés. Le premier point est la production des lipopeptides. Lors de nos essais en verger, il n'a pas été possible expérimentalement de produire autant du mélange FS que du mélange MS, nous contraignant à diviser par deux la concentration de FS utilisée. Lors de cet essai, un impact de l'effet de la concentration a été observé. Cela peut expliquer pourquoi ce mélange est apparu moins efficace. Le second point à améliorer est la formulation du produit, il est essentiel pour commercialiser les lipopeptides. Même si les formulations utilisées ont résisté aux conditions climatiques, il peut être important d'améliorer la formulation pour augmenter l'efficacité du produit, d'une part, pour améliorer l'interaction des lipopeptides avec les adjuvants et d'autre part, pour augmenter l'effet collant des lipopeptides sur les pommiers pour éviter qu'ils soient lessivés trop facilement par la pluie. Le dernier point à améliorer est la connaissance du mode d'action des lipopeptides. Cela permettrait de choisir au mieux les lipopeptides et leurs ratios. Dans nos essais en

verger, seules la surfactine, la mycosubtiline et la fengycine ont été testées. Cependant, d'autres mélanges faisant intervenir d'autres lipopeptides mériteraient également d'être testés, comme d'autres lipopeptides produits par *Pseudomonas* ou *Streptomyces*.

Cependant, il existe un inconvénient à l'utilisation des lipopeptides ou de l'organisme produisant les lipopeptides (Ex : *Bacillus* QST 713). L'homologation de ces produits est longue. En effet, l'utilisation des agents de biocontrôle et les substances biocides doivent être évaluée et autorisée pour faire partie de la réglementation européenne et française. La réglementation européenne sur les pesticides comprend quatre textes législatifs régissant les produits phytosanitaires dans l'union européenne (Deravel *et al.*, 2014). Le règlement (CE) 1107/2009 soumet ces substances à la même procédure d'homologation que les substances des produits phytosanitaires conventionnels (Andrivon *et al.*, 2017). L'évaluation et l'approbation des substances actives se font au niveau européen, où l'Agence européenne de sécurité des aliments (EFSA) est chargée de l'évaluation. Une fois que le produit est homologué et inscrit à l'annexe du règlement UE/540/2011 il faut que ce produit soit autorisé sur le marché français (Andrivon *et al.*, 2017). Cette autorisation est délivrée par l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail). Les lipopeptides et les souches de *Bacillus* sont considérés comme étant dans la même catégorie suivant la même homologation que les produits phytosanitaires conventionnels (Deravel *et al.*, 2014a). Pour homologuer un mélange comme ceux testés lors de notre étude, il faut homologuer chaque lipopeptide séparément, d'autant plus, si les deux ont une activité biocide avérée, une homologation pour la fengycine et une autre pour la surfactine par exemple. Il est également possible de faire homologuer la souche produisant le mélange précisément, cela permettrait de réduire la difficulté d'homologation du produit.

Un axe de recherche portant sur la formulation des lipopeptides comme produits de biocontrôle est aussi une perspective intéressante de ces travaux. La formulation concerne le choix des substances actives, leurs concentrations mais aussi le choix des adjuvants. Concernant la concentration, deux concentrations en lipopeptides ont été testées seulement. Ces concentrations ont présenté des résultats intéressants mais il est possible de définir une concentration potentiellement plus efficace. Tout comme énoncé précédemment, le choix des adjuvants et leurs concentrations doivent être approfondis car c'est un aspect important pour la formulation. Enfin, il est important aussi de choisir les meilleurs ratios entre les lipopeptides antifongiques (fengycines et iturines) et les lipopeptides stimulants les défenses des plantes (surfactines). En trouvant ces ratios cela permettrait de protéger au mieux les pommiers par effet direct et effet indirect (Cawoy *et al.*, 2014; Platel *et al.*, 2023; Pršić and Ongena, 2020). De plus, le mélange de lipopeptides pourrait apporter un effet synergique à l'activité antifongique. Ces points d'amélioration pour la formulation pourraient aussi modifier les résultats sur la persistance des lipopeptides sur la peau et dans la chaire des pommes. Soit en diminuant leur persistance soit en l'augmentant. Cela dépendra des

adjuvants ou des concentrations en lipopeptides utilisés. Ainsi, les lipopeptides ne seraient plus des molécules prometteuses mais un produit de biocontrôle alternatif aux fongicides chimiques.

4. Résistance de *V. inaequalis* aux triazoles

Il existe de plus en plus de cas de résistance chez *V. inaequalis* aux triazoles. Afin de comprendre la différence de sensibilité de nos souches au tébuconazole, différents mécanismes ont été étudiés. Pour cela, nous avons utilisés des souches qui ont des sensibilités différentes au tébuconazole (triazole), l'une est sensible et la deuxième a une sensibilité réduite. Il a aussi été montré que ces souches ont les mêmes sensibilités au tétraconazole qui est aussi un triazole. Dans un article récent, ces mêmes souches ont montré les mêmes sensibilités à un troisième triazole, le difénoconazole (Moureu *et al.*, 2023). De nombreuses recherches ont été menées pour identifier des sensibilités réduites en verger (Cordero-Limon *et al.*, 2021; Polat and Bayraktar, 2021; Villani *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2010). Cependant, il y a moins de recherches portant sur la compréhension des mécanismes de résistance. La sensibilité de nos souches aux triazoles ayant été définie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des mécanismes de résistance aux triazoles. De plus, il a été vérifié s'il était possible que ces mécanismes aient un lien avec la différence de sensibilité à la fengycine. Pour cela, trois hypothèses pouvant expliquer le mécanisme de résistance aux triazoles ont été investiguées : les mutations du gène *Cyp51A*, la surexpression du gène *Cyp51A* et la surexpression des gènes codant pour les pompes à efflux (Price *et al.*, 2015; Villani *et al.*, 2016; Yaegashi *et al.*, 2020). La première hypothèse a été écartée car seule la souche sensible avait une mutation qui n'influence pas sa sensibilité aux triazoles. L'analyse de l'expression du gène *Cyp51A* a permis de montrer une surexpression cinq fois plus importante chez la souche Rs552 que chez la souche S755. L'analyse de la région en amont du gène montre deux insertions de 613 pb chez Rs552 comparée à S755. Ces deux insertions sont identiques. Les deux souches ont été comparées à une souche sensible de Villani *et al.* (2016). La souche S755 et Rs552 ont toutes les deux une insertion de 499 pb que cette souche sensible n'a pas. Cette insertion de 499 pb ne semble pas avoir d'effet sur la sensibilité de nos souches. Cependant les deux insertions de 613 pb chez Rs552 peuvent en avoir. L'étude des facteurs de transcription montre qu'il y a des sites de liaison possible au niveau de ces insertions. Ces sites de liaison sont présents chez les deux souches avec une plus grande occurrence chez Rs552. Cela pourrait expliquer la surexpression observée chez Rs552. Villani *et al.* (2016) ont observé également une surexpression du gène *Cyp51A* chez des souches résistantes au myclobutanil et/ou au difénoconazole. Parmi ces souches, il y a la présence d'un élément répété ayant les propriétés d'un facteur activateur de la transcription. Cependant, cet élément n'a pas été trouvé chez les souches résistantes au myclobutanil seul, mais bien chez les souches résistantes au myclobutanil et difénoconazole ou au difénoconazole seul. Yaegashi *et al.* (2020) ont montré parmi une population étudiée dans des vergers au Japon que les résistances ne sont pas dues à une surexpression du gène *Cyp51A*. Les résistances sont dues

seulement à des mutations de ce même gène éventuellement couplées à un ou plusieurs autres mécanismes de résistance. Cela confirme que différents mécanismes peuvent expliquer la différence de sensibilité aux triazoles. De plus, la présence d'éléments répétés dans le génome permet à *V. inaequalis* de pouvoir s'adapter aux différentes variétés de pommiers et à différents stress dont les fongicides. Selon Lo Presti *et al.*, (2015), de petites protéines sécrétées induisent la virulence des phytopathogènes. Les gènes codant pour ces protéines se situent souvent dans des régions équilibrées en GC (Le Cam *et al.*, 2019). Mais ils peuvent également être proche d'éléments répétés (Deng *et al.*, 2017). A partir de ces données, on peut supposer que plus il y a d'éléments répétés, plus la souche aura de résistance.

La dernière hypothèse concerne les pompes à efflux ABC ou MFS. Pour rappel, les phytopathogènes ayant davantage de pompes à efflux peuvent effluer plusieurs types de molécules et donc résister à un ou plusieurs fongicides. Ce mécanisme a été mis en évidence chez nos souches par des analyses d'activité des fongicides en présence de modulateurs de pompes à efflux. Cette analyse a permis de montrer un efflux accru chez la souche Rs552 en présence de tébuconazole et tolnaftate. L'efflux accru peut être dû à une surexpression des gènes encodant les pompes à efflux (Chatzidimopoulos *et al.*, 2022; Leroux and Walker, 2013; Omrane *et al.*, 2015). L'analyse des gènes a permis d'observer la présence de quatre gènes *ABC* et un gène *MFS* chez nos souches de *V. inaequalis*. L'analyse de la région en amont des gènes *ABC* a permis d'identifier quelques sites de fixation de facteur de transcription. Dans le cas de ce gène, il y aurait davantage de sites de fixation chez la souche Rs552 que chez la souche S755. Ces résultats font penser que les pompes à efflux font parties du mécanisme de résistance chez Rs552. Par ailleurs, une étude menée sur *Z. tritici* a montré une surexpression de plusieurs gènes codant pour des pompes, y compris le gène *MgMFS1* (Omrane *et al.*, 2015). L'inactivation de ce gène a annulé la résistance de fongicide ayant différents modes d'action. Une autre étude a identifié deux loci de caractères quantitatifs (QTL, quantitative trait *loci*) impliqués dans la résistance de *V. inaequalis* au tébuconazole (Heaven *et al.*, 2023). Le premier QTL concerne le gène *Cyp51* et le second les pompes MFS. De plus, des gènes des pompes ABC semblent également impliqués dans la résistance mais dans une moindre mesure que les pompes MFS. Cette étude a été réalisée chez une population du Royaume Uni. Dans notre cas, la surexpression du gène *Cyp51A* est certainement la cause de la sensibilité réduite aux triazoles, probablement couplée à une activité d'efflux accrue des pompes ABC et MFS. De plus, les expériences de surexpression du gène *Cyp51A* et l'analyse de l'efflux des pompes ont été réalisées en présence de fengycine pour vérifier s'il y avait un lien entre la résistance aux triazoles et à la fengycine. Les résultats montrent que la fengycine n'induit pas de surexpression du gène *Cyp51A* et qu'elle n'est pas effluée par les pompes. Nous pouvons donc conclure que la sensibilité réduite aux triazoles de la souche Rs552 n'a pas de lien avec la résistance à la fengycine. Un ou d'autres mécanismes causent la résistance à la fengycine chez Rs552. Comme perspective, il serait intéressant de faire une étude population sur la recherche de résistance aux lipopeptides et aux triazoles et de déterminer les mécanismes de ces résistances. En

effet, la souche Rs552 n'a jamais été en contact avec des lipopeptides et pourtant elle présente une résistance à la fengycine. Il serait intéressant de voir si d'autres souches peuvent être résistantes et de vérifier les mécanismes de résistances mis en jeu.

Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour éclaircir certains résultats ou les valider. Concernant les mécanismes de résistance aux triazoles, il serait intéressant de confirmer les sites de liaison putatifs des facteurs de transcription par l'immunoprécipitation de la chromatine combinée à du séquençage. Cela permettrait de déterminer si les facteurs de transcription et leurs sites de liaison sont bien ceux identifiés. Ce travail devrait être répété pour les gènes codant les pompes à efflux couplé à l'étude de l'expression des gènes codant les pompes à efflux. Ces expériences sont proposées dans le but de statuer sur le mécanisme d'efflux. De plus, faire le dosage de la C14 déméthylase par rapport à l'augmentation de l'expression de la *Cyp51A* serait intéressant pour être sûr que l'expression du gène influe bien sur la biosynthèse des stérols. Cet axe permettrait de compléter la recherche sur les mécanismes de résistance aux triazoles.

5. Mode d'action des lipopeptides

La composition lipidique totale des deux souches de *V. inaequalis* a été déterminée. Des différences ressortent de cette composition lipidique. Les plus marquantes sont la différence qualitative de l'ergosta-7,22-dien-3-ol qui est davantage présent chez Rs552 que chez S755, mais également PI présent en plus grand pourcentage chez S755 que chez Rs552. La surexpression du gène *Cyp51A*, dont nous avons discuté précédemment, peut être associée avec la différence dans la composition relative de l'ergosta-7,22-dien-3-ol plus présent chez Rs552. Effectivement, si la souche Rs552 surexprime le gène *Cyp51A* cela peut permettre à la souche de produire plus de C-14 déméthylase, une enzyme participant à la biosynthèse de l'ergostérol. Cette modification peut avoir un impact dans la fluidité membranaire permettant à la souche de résister à la fengycine. En effet, plus il y a de stérols dans la membrane plus celle-ci va être rigide, ce qui peut limiter l'insertion de la fengycine dans la membrane (Mantil *et al.*, 2019; Wise *et al.*, 2014). Les différences observées dans la composition des phospholipides peuvent également jouer sur la fluidité de la membrane. En outre certains phospholipides, phosphatidylinositol et les lysophospholipides sont connus pour être des médiateurs de la transduction des signaux (El-Bacha and Torres, 2016). A partir de nos résultats, une hypothèse est proposée : lors de l'interaction avec la fengycine ou tout autre lipopeptide, les lipides vont transmettre des signaux annonçant un stress extérieur à la cellule. La cellule va donc pouvoir réagir pour se défendre.

Des observations microscopiques du mycélium ont été réalisées pour vérifier si les lipopeptides causent des dommages visibles chez *V. inaequalis*. Les observations microscopiques montrent la formation de sphérules en présence de fengycine et de surfactine suggérant une interaction avec la membrane plasmique. Ce phénomène est présent chez les deux souches mais le nombre de sphérules observés chez S755 est

beaucoup plus important que chez Rs552. La présence de perturbations membranaires similaires a été observée chez d'autres phytopathogènes en présence de fengycine. Dans la majorité des cas, ce que nous appelons sphérules sont appelées structures vésiculaires. Ces structures ont pu être observées chez *B. cinerea* (Botcazon *et al.*, 2022), *M. grisea* (Zhang and Sun, 2018) et *F. oxysporum* (Xue *et al.*, 2023). Cependant, ce phénomène n'est pas observé en présence de lipopeptides appartenant à la famille des iturines. Cela peut être dû à une différence dans l'interaction de iturines et des fengycines/surfactines avec le champignon. De plus, les deux souches ont une sensibilité similaire à l'iturine A et à la mycosubtiline. Alors que la sensibilité à la fengycine est différenciée entre les deux souches. Cette différence dans les mécanismes chez les différentes familles permet d'énoncer une nouvelle hypothèse. Cette hypothèse peut être que la fengycine est dégradée par une enzyme suite à son interaction avec la souche Rs552. Une étude montre, en effet, que les lipopeptides de *Bacillus* peuvent être dégradés par *Streptomyces venezuela* (Rigolet *et al.*, 2023). L'article montre que les trois familles de lipopeptides sont dégradées d'abord par linéarisation du lipopeptide puis par dégradation de la partie peptidique. Les mécanismes impliqués sont dus à plusieurs enzymes, des estérases et des endoprotéases pour la linéarisation et des exo-protéases pour la dégradation du peptide. Dans notre cas, il est compliqué d'expliquer pourquoi seule la fengycine serait dégradée par Rs552. Nous pouvons supposer que l'interaction de la fengycine n'induit pas les mêmes signaux pour cette souche. Cela permettrait à Rs552 de produire des enzymes capables de dégrader la fengycine. L'interaction de l'iturine A, de la mycosubtiline et de la surfactine avec la membrane, serait quant à elle, différente, ne permettant pas à la souche Rs552 de produire des enzymes.

La résistance à la fengycine de Rs552 est un résultat innovant. En effet, la littérature présente peu de cas de résistance des phytopathogènes aux lipopeptides. Cependant, il est permis de penser que les phytopathogènes puissent résister aux lipopeptides. En effet, dans nos recherches nous avons testé l'activité des lipopeptides jusqu'à une concentration de 42 mg/L pour la souche de sensibilité réduite. Il est récurrent d'observer des concentrations minimales inhibitrices allant au-delà de 75 mg/L de fengycine. C'est le cas pour *A. solani* (100 mg/L), et *F. sambucinum* (75 mg/L) (Wise *et al.*, 2014). La fengycine est une molécule antifongique très active mais reste éloignée des concentrations des fongicides conventionnels. Cependant, couplée à un autre lipopeptide, comme la surfactine, un effet synergique peut être observé et cela permettrait une diminution de la concentration. Mais pour mieux comprendre le phénomène de résistance des lipopeptides, la compréhension du mode d'action est indispensable.

Un axe à développer est l'analyse lipidique et l'extraction de la membrane plasmique. Dans un premier temps, il serait intéressant de compléter l'analyse lipidique totale avec l'analyse des sphingolipides, car les sphingolipides sont des constituants essentiels des membranes plasmiques. Ils contribuent au maintien et à la rigidité de la membrane. Ils sont également impliqués dans la signalisation cellulaire

permettant la régulation de nombreux processus cellulaires. Mais, il serait également intéressant d'extraire et de doser spécifiquement les stérols estérifiés des stérols libres associés à la membrane. Dans un second temps, l'extraction et la purification de la membrane plasmique de *V. inaequalis* serait un développement important à réaliser afin de pouvoir analyser les lipides de la membrane spécifiquement. Cette membrane plasmique est, en effet, le premier site de contact des lipopeptides avec la cellule fongique. Une connaissance approfondie des lipides de la membrane plasmique des deux souches S755 et Rs552, permettrait, peut-être, de mieux identifier l'origine de la différence de sensibilité à la fengycine. Un protocole basé sur celui de Löffler *et al.* (2000) a été testé mais n'a pas été concluant. D'autres tests avec d'autres gradients de saccharose pourraient être effectués, par exemple. La connaissance de la composition lipidique de la membrane permettrait aussi d'élaborer des membranes artificielles biomimétiques pour évaluer et comprendre l'importance de la membrane plasmique du champignon et de certains de ses lipides dans le mécanisme d'action des lipopeptides. Pour cela, des membranes artificielles biomimétiques de la membrane plasmique de *V. inaequalis* seraient mises au point afin d'étudier l'interaction des lipopeptides avec celles-ci à l'échelle moléculaire. En jouant avec la composition lipidique des modèles, d'une part, et la structure du lipopeptide, d'autre part, il serait possible d'identifier la spécificité lipidique de l'interaction et les motifs structuraux du lipopeptide importants pour celle-ci. Cela a été étudié sur des modèles de plantes, des vésicules lipidiques, des monocouches ou bicouches lipidiques (Deleu *et al.*, 2014; Gilliard *et al.*, 2022). Pour poursuivre les investigations, il serait également intéressant d'étudier la quantité de stérol en présence de triazole ou de fengycine pour déterminer si l'un des deux fongicides ont une action sur la synthèse des stérols. Cela permettrait de confirmer les résultats déjà obtenus par biologie moléculaire mais également de déterminer si un lien existe entre la résistance aux triazoles et la résistance à la fengycine.

6. Conclusion

A la fin des trois ans de thèse, nous avons réussi à montrer l'intérêt de l'utilisation des lipopeptides comme produit de biocontrôle pour lutter contre *V. inaequalis*. Cela a été permis grâce aux essais *in-vitro* mais surtout aux essais menés en vergers. Nous avons aussi mis en évidence le mécanisme de sensibilité réduite d'une souche de *V. inaequalis*. Enfin, nous avons contribué à approfondir la compréhension du mode d'action des lipopeptides (surtout la fengycine) contre *V. inaequalis*, à partir d'activité antifongique, d'observations microscopiques et d'analyses lipidiques. L'ensemble des résultats de ce doctorat montre que les lipopeptides sont des molécules prometteuses pour lutter contre ce phytopathogène.

Le sujet portait exclusivement sur la tavelure du pommier, dû aux conditions climatiques du nord de la France et de la Belgique propices au développement de ce phytopathogène. Mais la tavelure existe sur d'autres arbres fruitiers notamment le poirier (*Venturia pirina*) et le pêcher (*Venturia carpophila*). Leurs fruits sont 13^{ème} et

14^{ème} fruits produits dans le monde en 2021 (Statista, 2023). Avec une production respective de 25,66 Mt et de 24,99 Mt (FAOSTAT, 2021; Statista, 2023). Pour traiter la tavelure du poirier et la tavelure du pêcher il est possible de choisir respectivement parmi une vingtaine de substance actives pour le poirier et trois pour le pêcher, en 2022 (Charbonnier and Pringard, 2022). Pour ces deux phytopathogènes, le cuivre est le produit phytosanitaire principalement utilisé. Il serait aussi intéressant de se pencher sur ces arbres fruitiers aussi touchés par la tavelure, afin de tester et de généraliser la formulation des lipopeptides contre l'ensemble des tavelures. Afin de diminuer l'utilisation du cuivre, et donc, de diminuer la pollution des eaux et des sols, mais aussi pour réduire l'utilisation de triazoles pouvant participer à l'augmentation des cas de résistance. De plus, bien que les lipopeptides soient des molécules prometteuses, il serait intéressant de comparer le cycle de vie total de la production à l'élimination des lipopeptides à celui des fongicides chimiques. Cela renvoie également à regarder les avantages et inconvénients de l'utilisation des lipopeptides que ce soit d'un point de vue des coûts de production, de l'influence écologique, de l'impact sur la biodiversité et d'un point de vue santé publique. Il est également intéressant d'utiliser les lipopeptides à bon escient pour limiter l'apparition de résistance, comme ce qui a pu se produire avec un grand nombre de fongicides chimiques. Leurs utilisations conviendraient aussi bien à l'agriculture biologique qu'à l'agriculture intégrée.

Productions scientifiques

Communications

Aline Leconte, Justine Jacquin, Jérôme Muchembled, Magali Deleu, François Coutte et Philippe Jacques. *Assessment of the role of efflux pumps to explain the reduced sensitivity of a Venturia inaequalis strain to tebuconazole, fengycin and surfactin*. Plant BioPro Tech - 28/06 au 01/07 2022, Reims, France. - Poster

Aline Leconte, Justine Jacquin, Caroline Deweer, Jérôme Muchembled, Magali Deleu, François Coutte et Philippe Jacques. *Etude in vitro et in planta de l'activité antifongique de différents lipopeptides de Bacillus sp. contre Venturia inaequalis*. Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes – 06/12 au 08/12 2022, Orléans, France. – Communication orale

Articles

Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., Deweer, C., Krier, F., Deleu, M., Oste, S., Jacques, P., Coutte, F. Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as Biocontrol Products against Apple Scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms* **2022**, *10*, 1810. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091810>

Aline Leconte, Justine Jacquin, Matthieu Duban, Caroline Deweer, Pauline Trapet, Frédéric Laruelle, Amaury Farce, Philippe Compère, Karin Sahmer, Valentin Fiévet, Alexis Hoste, Ali Siah, Anissa Lounès-Hadj Sahraoui, Philippe Jacques, François Coutte, Magali Deleu and Jérôme Muchembled. Deciphering the mechanisms involved in reduced sensitivity to azoles and fengycin lipopeptide in *Venturia inaequalis*. Soumis en avril 2024, accepté le 20 juin 2024 à Microbiological Research.

Bibliographie

- Ćimović, S., Wallis, A., Basedow, M., 2018. Two Years of Experience with RIMpro Apple Scab Prediction Model on Commercial Apple Farms in Eastern New York. *N. Y. State Hortic. Soc.* 26, 21–27.
- Andrивon, D., Bertrand, C., Brun, L., Daire, X., Fabre, F., Gary, C., Montarry, J., Nicot, P., Reignault, P., Tamm, Savini, I., 2017. Peut-on se passer du cuivre en protection des cultures biologiques ? Synthèse du rapport d'expertise scientifique collective. INRA.
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., 2023. Recent advances on the interaction of glycolipid and lipopeptide biosurfactants with model and biological membranes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 68, 101748. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2023.101748>
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1713, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. s., Sarris, D., Philippoussis, A., Papanikolaou, S., 2018. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *J. Appl. Microbiol.* 124, 336–367. <https://doi.org/10.1111/jam.13633>
- Ayer, K.M., Choi, M.-W., Smart, S.T., Moffett, A.E., Cox, K.D., 2020. The Effects of Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicide Dose and Mixture on Development of Resistance in *Venturia inaequalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e01196-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01196-20>
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Becher, R., Wirsal, S.G.R., 2012. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 825–840. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4195-9>
- Béchet, M., Castéra-Guy, J., Guez, J.-S., Chihib, N.-E., Coucheney, F., Coutte, F., Fickers, P., Leclère, V., Wathelet, B., Jacques, P., 2013. Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresour. Technol.* 145, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.123>
- Benejam, J., 2021. Résistances du pommier à la tavelure et au feu bactérien: interactions entre les résistances génétiques et induites par les SDP. Université d'Angers, Angers.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., Delcambe, L., 1979. Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; Inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. *J. Antibiot. (Tokyo)* 32, 828–833. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.828>
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., Delcambe, L., 1978. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 31, 284–288. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.31.284>

- Botcazon, C., Bergia, T., Lecouturier, D., Dupuis, C., Rochex, A., Acket, S., Nicot, P., Leclère, V., Sarazin, C., Rippa, S., 2022. Rhamnolipids and fengycins, very promising amphiphilic antifungal compounds from bacteria secretomes, act on *Sclerotiniaceae* fungi through different mechanisms. *Front. Microbiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.977633>
- Bowen, J.K., Mesarich, C.H., Bus, V.G.M., Beresford, R.M., Plummer, K.M., Templeton, M.D., 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab: *Venturia inaequalis*. *Mol. Plant Pathol.* 12, 105–122. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00656.x>
- Brandhorst, T.T., Kean, I.R.L., Lawry, S.M., Wiesner, D.L., Klein, B.S., 2019. Phenylpyrrole fungicides act on triosephosphate isomerase to induce methylglyoxal stress and alter hybrid histidine kinase activity. *Sci. Rep.* 9, 5047. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41564-9>
- Brent, K.J., Hollomon, D.W., 2007. Fungicide resistance: the assessment of risk, 2nd ed. Crop Life International, Brussels, Belgium.
- Brown, S., 2012. Apple, in: Badenes, M.L., Byrne, D.H. (Eds.), *Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding*. Springer US, Boston, MA, pp. 329–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_10
- Brun, L., Didelot, F., Parisi, L., 2007. Stratégies de protection innovantes contre la tavelure du pommier : conception, évaluation et intégration en verger. *Innov. Agron.* 1, 33–45. <https://doi.org/10.17180/06E2-Y743>
- Cabral, J.P., 1991. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by dodine (dodecylguanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 341–344. <https://doi.org/10.1128/aac.35.2.341>
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., Monk, B.C., 2009. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 291–321. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>
- Carisse, O., Dewdney, M., 2005. A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection* 83, 1–29. <https://doi.org/10.7202/706226ar>
- Carisse, O., Jobin, T., 2006. La tavelure du pommier: mieux comprendre pour mieux intervenir. *Agriculture et agroalimentaire Canada*, Ottawa.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J., 2019. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- 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 Interactions®* 27, 87–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>

- Cazenave, X., 2022. Valorisation des ressources génétiques du pommier dans une population d'amélioration élite grâce à la sélection génomique. Université d'Angers, Angers.
- Challis, G.L., Naismith, J.H., 2004. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 748–756. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.005>
- Chapman, K.S., Sundin, G.W., Beckerman, J.L., 2011. Identification of Resistance to Multiple Fungicides in Field Populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis.* 95, 921–926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0899>
- Charbonnier, E., Pringard, N., 2022. Index acta phytosanitaire. Association de coordination technique agricole, Paris, France.
- Chatzidimopoulos, M., Lioliopoulou, F., Sotiropoulos, T., Vellios, E., 2020. Efficient Control of Apple Scab with Targeted Spray Applications. *Agronomy* 10, 217. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020217>
- Chatzidimopoulos, M., Zambounis, A., Lioliopoulou, F., Vellios, E., 2022. Detection of *Venturia inaequalis* Isolates with Multiple Resistance in Greece. *Microorganisms* 10, 2354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122354>
- Chowdhury, S.P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin, P., Borriss, R., Hartmann, A., 2015. Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 28, 984–995. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-15-0066-R>
- Chukwudulue, U.M., Barger, N., Dubovis, M., Luzzatto Knaan, T., 2023. Natural Products and Pharmacological Properties of Symbiotic *Bacillota* (Firmicutes) of Marine Macroalgae. *Mar. Drugs* 21, 569. <https://doi.org/10.3390/md21110569>
- Coleman, J.J., Mylonakis, E., 2009. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLOS Pathog.* 5, e1000486. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000486>
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag. Sci.* 69, 150–155. <https://doi.org/10.1002/ps.3348>
- Cools, H.J., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2013. Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathol.* 62, 36–42. <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>
- Cordero-Limon, L., Shaw, M.W., Passey, T.A., Robinson, J.D., Xu, X., 2021. Cross-resistance between myclobutanil and tebuconazole and the genetic basis of tebuconazole resistance in *Venturia inaequalis*. *Pest Manag. Sci.* 77, 844–850. <https://doi.org/10.1002/ps.6088>
- Cornille, A., Antolín, F., Garcia, E., Vernesi, C., Fietta, A., Brinkkemper, O., Kirleis, W., Schlumbaum, A., Roldán-Ruiz, I., 2019. A Multifaceted Overview of Apple Tree Domestication. *Trends Plant Sci.* 24, 770–782. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.007>

- Cornille, A., Giraud, T., Bellard, C., Tellier, A., Le Cam, B., Smulders, M.J.M., Kleinschmit, J., Roldan-Ruiz, I., Gladieux, P., 2013. Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple. *Mol. Ecol.* 22, 2249–2263. <https://doi.org/10.1111/mec.12231>
- Cornille, Amandine, Giraud, T., Smulders, M.J.M., Roldán-Ruiz, I., Gladieux, P., 2013. The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends Genet. TIG* 30, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.10.002>
- Cornille, A., Gladieux, P., Smulders, M.J.M., Roldán-Ruiz, I., Laurens, F., Cam, B.L., Nersesyan, A., Clavel, J., Olonova, M., Feugey, L., Gabrielyan, I., Zhang, X.-G., Tenaillon, M.I., Giraud, T., 2012. New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties. *PLOS Genet.* 8, e1002703. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002703>
- Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Dhulster, P., 2010. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2504-8>
- Cox, K.D., 2015. Fungicide Resistance in *Venturia inaequalis*, the Causal Agent of Apple Scab, in the United States, in: Ishii, H., Hollomon, D.W. (Eds.), *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Springer Japan, Tokyo, pp. 433–447. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_27
- de Kroon, A.I.P.M., Rijken, P.J., De Smet, C.H., 2013. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Prog. Lipid Res.* 52, 374–394. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.006>
- Deacon, J.W., 2006. *Fungal biology*, 4th ed. Blackwell Publishing Ltd, Malden.
- Deleu, M., Bouffieux, O., Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Thonart, P., Jacques, P., Brasseur, R., 2003. Interaction of Surfactin with Membranes: A Computational Approach. *Langmuir* 19, 3377–3385. <https://doi.org/10.1021/la026543z>
- Deleu, M., Crowet, J.-M., Nasir, M.N., Lins, L., 2014. Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838, 3171–3190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023>
- Deleu, M., Lorent, J., Lins, L., Brasseur, R., Braun, N., El Kirat, K., Nylander, T., Dufrêne, Y.F., Mingeot-Leclercq, M.-P., 2013. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 801–815. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.007>

- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2008. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophys. J.* 94, 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 283, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>
- Deng, C.H., Plummer, K.M., Jones, D.A.B., Mesarich, C.H., Shiller, J., Taranto, A.P., Robinson, A.J., Kastner, P., Hall, N.E., Templeton, M.D., Bowen, J.K., 2017. Comparative analysis of the predicted secretomes of *Rosaceae* scab pathogens *Venturia inaequalis* and *V. pirina* reveals expanded effector families and putative determinants of host range. *BMC Genomics* 18, 339. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3699-1>
- Deravel, J., Krier, F., Jacques, P., 2014a. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Société Environ.*
- Deravel, J., Lemièvre, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., Jacques, P., 2014b. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255–6264. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., Jacques, P., 2019. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>
- Dreyfus, J., Roussel, M., 2008. Fiche technique: La tavelure.
- Eastmond, D.A., Balakrishnan, S., 2010. Chapter 11 - Genotoxicity of Pesticides, in: Krieger, R. (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edition). Academic Press, New York, pp. 357–380. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00011-2>
- El-Bacha, T., Torres, A.G., 2016. Phospholipids: Physiology, in: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, pp. 352–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00540-7>
- Ermakova, E., Zuev, Y., 2017. Effect of ergosterol on the fungal membrane properties. All-atom and coarse-grained molecular dynamics study. *Chem. Phys. Lipids* 209, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.11.006>
- Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Vauchel, P., Jacques, P., Nikov, I., 2012. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresour. Technol.* 126, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.019>
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T.J., 2013. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus*

- subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. J. Chem. Ecol. 39, 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- FAOSTAT, 2021. Données de l'alimentation et de l'agriculture.
- Faro, L.R., 2010. Neurotoxic Effects of Triazole Fungicides on Nigrostriatal Dopaminergic Neurotransmission, in: Carisse, O. (Ed.), Fungicides. InTech. <https://doi.org/10.5772/13109>
- Farzaneh, M., Shi, Z.-Q., Ahmadzadeh, M., Hu, L.-B., Ghassempour, A., 2016. Inhibition of the *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Contamination on Pistachio Nut by Fengycin and Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* UTBSP1. Plant Pathol. J. 32, 209–215. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2015.0250>
- Fobert, P.R., Després, C., 2005. Redox control of systemic acquired resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 8, 378–382. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.003>
- FRAC, 2023. Pathogen Risk List [WWW Document]. Fungic. Resist. Action Comm. URL <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2023---final.pdf> (accessed 1.30.24).
- Francius, G., Dufour, S., Deleu, M., Paquot, M., Mingeot-Leclercq, M.-P., Dufrêne, Y.F., 2008. Nanoscale membrane activity of surfactins: Influence of geometry, charge and hydrophobicity. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1778, 2058–2068. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.023>
- Fritze, D., 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology 94, 1245–1248. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>
- Gao, L., Berrie, A., Yang, J., Xu, X., 2009. Within- and between-orchard variability in the sensitivity of *Venturia inaequalis* to myclobutanil, a DMI fungicide, in the UK. Pest Manag. Sci. 65, 1241–1249. <https://doi.org/10.1002/ps.1816>
- Geoghegan, I., Steinberg, G., Gurr, S., 2017. The Role of the Fungal Cell Wall in the Infection of Plants. Trends Microbiol. 25, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.015>
- Gilliard, G., Furlan, A.L., Smeralda, W., Pršić, J., Deleu, M., 2022. Added Value of Biophysics to Study Lipid-Driven Biological Processes: The Case of Surfactins, a Class of Natural Amphiphile Molecules. Int. J. Mol. Sci. 23, 13831. <https://doi.org/10.3390/ijms232213831>
- Godeau, C., 2022. Evaluation of the impact of the dissemination of triazole fungicides in agriculture on *Aspergillus fumigatus* and proposal of solutions (These de doctorat). Bourgogne Franche-Comté.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., Sadaie, Y., 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 46, 1–8. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.1>
- Guez, J.-S., Coucheney, F., Guy, J., Béchet, M., Fontanille, P., Chihib, N.-E., Niehren, J., Coutte, F., Jacques, P., 2022. Bioinformatics Modelling and Metabolic Engineering of the Branched Chain Amino Acid Pathway for Specific

- Production of Mycosubtilin Isoforms in *Bacillus subtilis*. *Metabolites* 12, 107. <https://doi.org/10.3390/metabo12020107>
- Guimaraes, L.L., Toledo, M.S., Ferreira, F.A.S., Straus, A.H., Takahashi, H.K., 2014. Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00138>
- Guo, P., Yang, F., Ye, S., Li, J., Shen, F., Ding, Y., 2023. Characterization of lipopeptide produced by *Bacillus altitudinis* Q7 and inhibitory effect on *Alternaria alternata*. *J. Basic Microbiol.* 63, 26–38. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200530>
- Gupta, P.K., 2017. Chapter 37 - Herbicides and Fungicides, in: Gupta, R.C. (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (Second Edition). Academic Press, pp. 657–679. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00037-8>
- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K., Hibi, T., 2000. Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14 α -Demethylase Gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3421–3426.
- Hamley, I.W., Dehsorkhi, A., Jauregi, P., Seitsonen, J., Ruokolainen, J., Coutte, F., Chataigne, G., Jacques, P., 2013. Self-assembly of three bacterially-derived bioactive lipopeptides. *Soft Matter* 9, 9572–9578. <https://doi.org/10.1039/C3SM51514A>
- Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Heaven, T., Armitage, A.D., Xu, X., Goddard, M.R., Cockerton, H.M., 2023. Dose-Dependent Genetic Resistance to Azole Fungicides Found in the Apple Scab Pathogen. *J. Fungi* 9, 1136. <https://doi.org/10.3390/jof9121136>
- Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, Gow (Eds.), 2017a. Cell Biology of Hyphal Growth, in: *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, pp. 231–265. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0034-2016>
- Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, Gow (Eds.), 2017b. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function, in: *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, pp. 267–292. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Hoffmann, L.L., 2003. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). (phdthesis). Université Louis Pasteur - Strasbourg I, Starsbourg.
- Hoffmeister, M., Scheu, P., Glaab, A., Zito, R., Stammer, G., 2023. Sensitivity evolution in *Venturia inaequalis* towards SDHs in comparison to other

- modes of action. Eur. J. Plant Pathol. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02798-6>
- Holb, I.J., 2006. Scab control management strategies in environmentally - Benign apple production systems. Phytopathol. Pol. 39, 31–39.
- Hu, F., Liu, Y., Li, S., 2019. Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. Microb. Cell Factories 18, 42. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>
- Hulvey, J., Popko, J.T., Sang, H., Berg, A., Jung, G., 2012. Overexpression of *ShCYP51B* and *ShatrD* in *Sclerotinia homoeocarpa* Isolates Exhibiting Practical Field Resistance to a Demethylation Inhibitor Fungicide. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6674–6682. <https://doi.org/10.1128/AEM.00417-12>
- Jacques, P., 2011. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp., in: Soberón-Chávez, G. (Ed.), Biosurfactants, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 57–91. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_3
- Jobin, T., Carisse, O., 2007. Incidence of Myclobutanil- and Kresoxim-Methyl-Insensitive Isolates of *Venturia inaequalis* in Quebec Orchards. Plant Dis. 91, 1351–1358. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1351>
- Jones, A., Walker, R., 1976. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungi- cides in Michigan., in: The Plant Disease Reporter. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service., pp. 40–44.
- Juniper, B.E., Mabberley, D.J., 2006. The Story of the Apple. Timber Press, portland, USA.
- Katan, T., Shabi, E., Gilpatrick, J., 1983. Genetics of resistance to benomyl in *Venturia inaequalis* isolates from Israel and New York. Phytopathology® 73, 600–603. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-600>
- Khan, M.A., Olsen, K.M., Sovero, V., Kushad, M.M., Korban, S.S., 2014. Fruit quality traits have played critical roles in domestication of the apple. Plant Genome 7. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.04.0018>
- Koenraadt, H., Somerville, S.C., Jones, A.L., 1992. Characterization of Mutations in the Beta-Tubulin Gene of Benomyl-Resistant Field Strains of *Venturia inaequalis* and Other Plant Pathogenic Fungi. Phytopathology 82, 1348. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-1348>
- Köller, W., 1991. Baseline Sensitivities of *Venturia inaequalis* to Sterol Demethylation Inhibitors. Plant Dis. 75, 726. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0726>
- Köller, W., Parker, D.M., Turechek, W.W., Avila-Adame, C., Cronshaw, K., 2004. A Two-Phase Resistance Response of *Venturia inaequalis* Populations to the QoI Fungicides Kresoxim-Methyl and Trifloxystrobin. Plant Dis. 88, 537–544. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.537>
- Köller, W., Smith, F.D., Reynolds, K.L., Wilcox, W.F., Burr, J.A., 1995. Seasonal changes of sensitivities to sterol demethylation inhibitors in *Venturia inaequalis* populations. Mycol. Res. 99, 689–692. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80529-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80529-7)

- Korban, S.S., 2021. The Apple Genome. Compendium of Plant Genomes., 1st edition. ed. Springer-Nature Publishers, Cham, Switzerland.
- Kretschmer, M., Leroux, P., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M.A., Hahn, M., 2009. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.* 5, e1000696. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
- Krishnan, N., Velramar, B., Velu, R.K., 2019. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 155, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.01.010>
- Kunz, S., Deising, H., Mendgen, K., 1997. Acquisition of Resistance to Sterol Demethylation Inhibitors by Populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87, 1272–1278. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1997.87.12.1272>
- Laget, E., Guadagini, M., Plénet, D., Simon, S., Assié G., Billote B., Borioli P., Bourgouin B., Fratantuono M., Guérin A., Hucbourg B., Lemarquand A., Loquet B., Mercadal M., Parveaud C-E, Ramade L., Rames M-H., Ricaud V., Rousselou C., Sagnes J-L., Zavagli F, 2015. Guide pour la conception de systèmes de production fruitière économes en produits phytomédicamenteux.
- Le Cam, B., Sargent, D., Gouzy, J., Amselem, J., Bellanger, M.-N., Bouchez, O., Brown, S., Caffier, V., De Gracia, M., Debuchy, R., Duvaux, L., Payen, T., Sannier, M., Shiller, J., Collemare, J., Lemaire, C., 2019. Population Genome Sequencing of the Scab Fungal Species *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Venturia aucupariae* and *Venturia asperata*. *G3 GenesGenomesGenetics* 9, 2405–2414. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400047>
- Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M.-N., Gaucher, M., Deleu, M., Jijakli, M.H., 2018. Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. *Agriculture* 8, 11. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010011>
- Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P., 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol.* 186, 475–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0163-z>
- Leroux, P., Walker, A.-S., 2013. Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 135, 683–693. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0105-3>
- Leroux, P., Walker, A.-S., 2010. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 16.

- Leroy, T., Lemaire, C., Dunemann, F., Le Cam, B., 2013. The genetic structure of a *Venturia inaequalis* population in a heterogeneous host population composed of different *Malus* species. *BMC Evol. Biol.* 13, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-64>
- Li, X., Li, H., Yu, Z., Gao, L., Yang, J., 2021. Investigating the sensitivity of *Venturia inaequalis* isolates to difenoconazole and pyraclostrobin in apple orchards in China. *Eur. J. Plant Pathol.* 161, 207–217. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02316-6>
- Lim, Y.P., Go, M.K., Yew, W.S., 2016. Exploiting the Biosynthetic Potential of Type III Polyketide Synthases. *Molecules* 21, 806. <https://doi.org/10.3390/molecules21060806>
- Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., Roskoski, R., 1971. Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35, 1–34. <https://doi.org/10.1002/9780470122808.ch1>
- Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-Moussa, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.07.004>
- Liu, L., Jin, X., Lu, X., Guo, L., Lu, P., Yu, H., Lv, B., 2023. Mechanisms of Surfactin from *Bacillus subtilis* SF1 against *Fusarium foetens*: A Novel Pathogen Inducing Potato Wilt. *J. Fungi* 9, 367. <https://doi.org/10.3390/jof9030367>
- Liu, Y., Lu, J., Sun, J., Zhu, X., Zhou, L., Lu, Z., Lu, Y., 2019. C16-Fengycin A affect the growth of *Candida albicans* by destroying its cell wall and accumulating reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 8963–8975. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10117-5>
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., Kahmann, R., 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>
- Löffler, J., Einsele, H., Hebart, H., Schumacher, U., Hraštík, C., Daum, G., 2000. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 59–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09040.x>
- Lumbsch, H.T., Huhndorf, S.M., 2007. Notes on ascomycete systematics Nos. 4408 - 4750 41.
- Luo, C.-X., Schnabel, G., 2008. The Cytochrome P450 Lanosterol 14 α -Demethylase Gene Is a Demethylation Inhibitor Fungicide Resistance Determinant in *Monilinia fructicola* Field Isolates from Georgia. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 359–366. <https://doi.org/10.1128/AEM.02159-07>
- Lye, C.D., Laigret, F.D.R., Corio-Costet, M.-F., 1997. A Mutation in the 14 α -Demethylase Gene of *Uncinula necator* That Correlates with Resistance to a Sterol Biosynthesis Inhibitor. *APPL Env. MICROBIOL* 63, 5.

- Ma, Z., Proffer, T.J., Jacobs, J.L., Sundin, G.W., 2006. Overexpression of the 14 α -Demethylase Target Gene (CYP51) Mediates Fungicide Resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2581–2585. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2581-2585.2006>
- MacHardy, W.E., Gadoury, D.M., Gessler, C., 2001. Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Dis.* 85, 1036–1051. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1036>
- Maget-Dana, R., Ptak, M., Peypoux, F., Michel, G., 1985. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 815, 405–409. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90367-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90367-0)
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74, 1047–1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)
- Mannock, D.A., Lewis, R.N.A.H., McMullen, T.P.W., McElhaney, R.N., 2010. The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid–sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 163, 403–448. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.03.011>
- Mantil, E., Crippin, T., Avis, T.J., 2019. Domain redistribution within ergosterol-containing model membranes in the presence of the antimicrobial compound fengycin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1861, 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.01.003>
- Marahiel, M.A., 2009. Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 15, 799–807. <https://doi.org/10.1002/psc.1183>
- Mejri, S., Siah, A., Coutte, F., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Tisserant, B., Krier, F., Jacques, P., Reignault, P., Halama, P., 2018. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29822–29833. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>
- Mihalache, G., Balaes, T., Gostin, I., Stefan, M., Coutte, F., Krier, F., 2018. Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29784–29793. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9162-7>
- Ministère de l’agriculture et de la souveraineté alimentaire, DGAL, SDSPV, 2023. Liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle, au titre des articles L.253-5 et L.253-7 du code rural et de la pêche maritime.
- Mosbach, A., Edel, D., Farmer, A.D., Widdison, S., Barchietto, T., Dietrich, R.A., Corran, A., Scalliet, G., 2017. Anilinopyrimidine Resistance in *Botrytis cinerea* Is Linked to Mitochondrial Function. *Front. Microbiol.* 8.
- Moureu, S., Jacquin, J., Samaillie, J., Deweer, C., Rivière, C., Muchembled, J., 2023. Antifungal Activity of Hop Leaf Extracts and Xanthohumol on Two Strains of *Venturia inaequalis* with Different Sensitivities to Triazoles. *Microorganisms* 11, 1605. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061605>

- Moyne, A.L., Shelby, R., Cleveland, T.E., Tuzun, S., 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. J. Appl. Microbiol. 90, 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>
- Muchembled, J., Deweer, C., Sahmer, K., Halama, P., 2018. Antifungal activity of essential oils on two *Venturia inaequalis* strains with different sensitivities to tebuconazole. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 29921–29928. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0507-z>
- Munakata, Y., Heuson, E., Daboudet, T., Deracinois, B., Duban, M., Hehn, A., Coutte, F., Slezack-Deschaumes, S., 2022. Screening of Antimicrobial Activities and Lipopeptide Production of Endophytic Bacteria Isolated from *Vetiver* Roots. Microorganisms 10, 209. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020209>
- Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A.-S., Fillinger, S., 2015. Fungicide efflux and the *MgMFS1* transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. Environ. Microbiol. 8, 2805–2823. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12781>
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P., 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1940-3>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Oren, A., Garrity, G.M., 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71, 005056. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
- Pan, J., Hu, C., Yu, J.-H., 2018. Lipid Biosynthesis as an Antifungal Target. J. Fungi 4, 50. <https://doi.org/10.3390/jof4020050>
- Park, G., Nam, J., Kim, J., Song, J., Kim, P.I., Min, H.J., Lee, C.W., 2019. Structure and Mechanism of Surfactin Peptide from *Bacillus velezensis* Antagonistic to Fungi Plant Pathogens. Bull. Korean Chem. Soc. 40, 704–709. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11757>
- Parker, J.E., Warrilow, A.G.S., Price, C.L., Mullins, J.G.L., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. J. Chem. Biol. 7, 143–161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>
- Patel, H., Tscheka, C., Edwards, K., Karlsson, G., Heerklotz, H., 2011. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1808, 2000–2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.04.008>
- Perczyk, P., Wójcik, A., Wydro, P., Broniatowski, M., 2020. The role of phospholipid composition and ergosterol presence in the adaptation of fungal membranes

- to harsh environmental conditions–membrane modeling study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1862, 183136. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183136>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Peypoux, F., Pommier, M.T., Das, B.C., Besson, F., Delcambe, L., Michel, G., 1984. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 37, 1600–1604. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1600>
- Platel, R., Lucau-Danila, A., Baltenweck, R., Maia-Grondard, A., Trapet, P., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Duret, M., Halama, P., Hilbert, J.-L., Coutte, F., Jacques, P., Hugueney, P., Reignault, P., Siah, A., 2023. Deciphering immune responses primed by a bacterial lipopeptide in wheat towards *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074447>
- Polat, Z., Bayraktar, H., 2021. Resistance of *Venturia inaequalis* to multiple fungicides in Turkish apple orchards. *J. Phytopathol.* 169, 360–368. <https://doi.org/10.1111/jph.12990>
- Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2015. Azole fungicides -- understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag. Sci.* 71, 1054–1058. <https://doi.org/10.1002/ps.4029>
- Pršić, J., Ongena, M., 2020. Elicitors of Plant Immunity Triggered by Beneficial Bacteria. *Front. Plant Sci.* 11, 594530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594530>
- Rahman, A., Uddin, W., Wenner, N.G., 2015. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Mol. Plant Pathol.* 16, 546–558. <https://doi.org/10.1111/mpp.12209>
- Rigolet, A., Argüelles Arias, A., Anckaert, A., Quinton, L., Rigali, S., Tellatin, D., Burguet, P., Ongena, M., 2023. Lipopeptides as rhizosphere public goods for microbial cooperation. *Microbiol. Spectr.* 12, e03106-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03106-23>
- Ripa, I., Andreu, S., López-Guerrero, J.A., Bello-Morales, R., 2021. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Front. Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631274>
- Rizzo, J., Stanchev, L.D., da Silva, V.K.A., Nimrichter, L., Pomorski, T.G., Rodrigues, M.L., 2019. Role of lipid transporters in fungal physiology and pathogenicity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 1278–1289. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.09.001>
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl024>

- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® 20, 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Rosenberg, E., Ron, E.Z., 2013. Biosurfactants, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 281–294. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_29
- Roubal, C., 2017. Tavelures du pommier et de l'olivier : réalisation de modèles épidémiologiques par des méthodes exploitant des observations biologiques acquises au verger (These de doctorat). Avignon.
- Samel, S.A., Czodrowski, P., Essen, L.-O., 2014. Structure of the epimerization domain of tyrocidine synthetase A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 1442–1452. <https://doi.org/10.1107/S1399004714004398>
- Samel, S.A., Marahiel, M.A., Essen, L.-O., 2008. How to tailor non-ribosomal peptide products—new clues about the structures and mechanisms of modifying enzymes. *Mol. Biosyst.* 4, 387–393. <https://doi.org/10.1039/B717538H>
- Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A., Essen, L.-O., 2006. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J. Mol. Biol.* 359, 876–889. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.062>
- Schnabel, G., Jones, A.L., 2001. The 14 α -Demethylase(*CYP51A1*) Gene is Overexpressed in *Venturia inaequalis* Strains Resistant to Myclobutanil. *Phytopathology*® 91, 102–110. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.102>
- Schumacher, C.F.A., Steiner, U., Dehne, H.-W., Oerke, E.-C., 2008. Localized Adhesion of Nongerminated *Venturia inaequalis* Conidia to Leaves and Artificial Surfaces. *Phytopathology*® 98, 760–768. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-7-0760>
- Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M.A., 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* 20, 275–287. <https://doi.org/10.1039/B111145K>
- Schwinn, F.J., 1984. Ergosterol biosynthesis inhibitors. An overview of their history and contribution to medicine and agriculture. *Pestic. Sci.* 15, 40–47. <https://doi.org/10.1002/ps.2780150107>
- Sévély, C., Gallia, V., Fratantuono, M., Agogué, C., Aguilar Huana, R., Alison, B., Allix, M., Balajas, J., Blanc, P., Berger, M.-N., Codini, M., Courthieu, N., Courtial, D., Delobel, C., Delon, P., Dubernard, N., Dussaud, A., Hardy, S., Hostalnou, E., Laborde, A., Lagrande, H., Lasserre, M., Mathieu, V., Milleliri, I., Mouiren, C., Portal, C., Reynold De Seresin, H., Ricaud, V., Ristori, M., 2023. *Sud Arbo® 2023 : guide de la protection raisonnée et biologique en Languedoc-Roussillon*.

- Shahinasi, E., Brahushi, F., Devolli, A., Kodra, M., 2017. The ecotoxicology of pesticides group of triazole and their use to control apple scab (*Venturia inaequalis*). J. Hyg. Eng. Des. 18, 7. <https://doi.org/10.5555/20173275283>
- Shirane, N., Takenaka, H., Ueda, K., Hashimoto, Y., Katoh, K., Ishii, H., 1996. Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. Phytochemistry 41, 1301–1308. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00787-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00787-3)
- Snook, M.E., Mitchell, T., Hinton, D.M., Bacon, C.W., 2009. Isolation and characterization of leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. J. Agric. Food Chem. 57, 4287–4292. <https://doi.org/10.1021/jf900164h>
- Spengler, R.N., 2019. Origins of the Apple: The Role of Megafaunal Mutualism in the Domestication of *Malus* and *Rosaceous* Trees. Front. Plant Sci. 10, 617. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00617>
- Stammler, G., Brix, H.D., Nave, B., Gold, R., Schoefl, U., 2007. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. Presented at the Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, pp. 45–51.
- Stammler, G., Cordero, J., Koch, A., Semar, M., Schlehuber, S., 2009. Role of the Y134F mutation in cyp51 and overexpression of cyp51 in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole. Crop Prot. 7.
- Statista, R.D., 2023. Volume de la production de fruits dans le monde en 2021 [WWW Document]. Statista. URL <https://fr.statista.com/statistiques/673783/production-mondiale-de-fruits-dans-le-monde/>
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56, 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Stephenson, S.L., 2010. The Kingdom fungi: the biology of mushrooms, molds, and lichens. Timber Press, Portland.
- Sun, X., Jiao, C., Schwaninger, H., Chao, C.T., Ma, Y., Duan, N., Khan, A., Ban, S., Xu, K., Cheng, L., Zhong, G.-Y., Fei, Z., 2020. Phased diploid genome assemblies and pan-genomes provide insights into the genetic history of apple domestication. Nat. Genet. 52, 1423–1432. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00723-9>
- Sun, X., Xu, Q., Ruan, R., Zhang, T., Zhu, C., Li, H., 2013. PdMLE1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance. Environ. Microbiol. Rep. 5, 135–142. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12012>
- Sur, S., Romo, T.D., Grossfield, A., 2018. Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. J. Phys. Chem. B 122, 2219–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11889>
- Talebi, A., de Laat, V., Spotbeen, X., Dehairs, J., Rambow, F., Rogiers, A., Vanderhoydonc, F., Rizotto, L., Planque, M., Doglioni, G., Motamedi, S.,

- Nittner, D., Roskams, T., Agostinis, P., Bechter, O., Boecxstaens, V., Garmyn, M., O'Farrell, M., Wagman, A., Kemble, G., Leucci, E., Fendt, S.-M., Marine, J.-C., Swinnen, J.V., 2023. Pharmacological induction of membrane lipid poly-unsaturation sensitizes melanoma to ROS inducers and overcomes acquired resistance to targeted therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 42, 92. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02664-7>
- Tanaka, K., Ishihara, A., Nakajima, H., 2014. Isolation of anteiso-C17, iso-C17, iso-C16, and iso-C15 Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32 and Their Antifungal Activities against Plant Pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1469–1476. <https://doi.org/10.1021/jf404531t>
- Théâtre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M.H., Léonard, A., Lins, L., Arabolaza, A., Gramajo, H., Gross, H., Jacques, P., 2021. The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9.
- Théâtre, A., Hoste, A.C.R., Rigolet, A., Benneceur, I., Bechet, M., Ongena, M., Deleu, M., Jacques, P., 2022. *Bacillus* sp.: A Remarkable Source of Bioactive Lipopeptides. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 181, 123–179. https://doi.org/10.1007/10_2021_182
- Toffolatti, S.L., Venturini, G., Bianco, P.A., 2016. First Report of SDHI Resistant Strains of *Venturia inaequalis* From Commercial Orchards in Northern Italy. *Plant Dis.* 100, 2324. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0361-PDN>
- Trapman, M., Polfliet, M., 1997. Management of primary infections of apple-scab with the simulation program RIMpro: review of four years field trials., in: IOBC-WRPS Bull. Presented at the 4th workshop on Integrated control of pome fruit diseases, Croydon, UK, pp. 241–250.
- Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., Sieber, S.A., 2002. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* 41, 13350–13359. <https://doi.org/10.1021/bi026592a>
- Turner, M.L., 1986. Germination and Appressorium Formation by *Venturia inaequalis* During Infection of Apple Seedling Leaves. *Plant Dis.* 70, 658. <https://doi.org/10.1094/PD-70-658>
- Van, A., 2011. Potentiel évolutif du pouvoir pathogène de *Venturia inaequalis* en lien avec la domestication du pommier et l'utilisation de résistances quantitatives en amélioration variétale. Université d'Angers, Angers.
- Van, A.L., Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Chauveau, A., Brunel, D., Le Cam, B., Durel, C.-E., 2013. Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: a case study in an apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *New Phytol.* 197, 899–908. <https://doi.org/10.1111/nph.12086>
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G., 1986. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot. (Tokyo)* 39, 888–901. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>

- Vassaux, A., 2019. Mécanisme de biosynthèse et production de l'astine, un pentapeptide cyclique non-ribosomique de *Cyanodermella asteris* (These de doctorat). Université de Lille (2018-2021).
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchiotti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagné, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouzé, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.-E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat. Genet.* 42, 833–839. <https://doi.org/10.1038/ng.654>
- Venturia inaequalis* (ID 49733) - Genome - NCBI [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=venturia%20inaequalis> (accessed 10.28.20).
- Vijaya Palani, P., Lalithakumari, D., 1999. Resistance of *Venturia inaequalis* to the sterol biosynthesis-inhibiting fungicide, penconazole [1-(2-(2,4-dichlorophenyl) pentyl)-1H-1,2,4-triazole]. *Mycol. Res.* 103, 1157–1164. <https://doi.org/10.1017/S0953756299008321>
- Villani, S.M., Biggs, A.R., Cooley, D.R., Raes, J.J., Cox, K.D., 2015. Prevalence of Myclobutanil Resistance and Difenconazole Insensitivity in Populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis.* 99, 1526–1536. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0002-RE>
- Villani, S.M., Hulvey, J., Hily, J.-M., Cox, K.D., 2016. Overexpression of the *CYP51A1* Gene and Repeated Elements are Associated with Differential Sensitivity to DMI Fungicides in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology®* 106, 562–571. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-15-0254-R>
- Wang, Q.-Y., Lin, Q.-L., Peng, K., Cao, J.-Z., Yang, C., Xu, D., 2017. Surfactin Variants from *Bacillus subtilis* natto CSUF5 and Their Antifungal Properties Against *Aspergillus niger*. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 11, 210–215. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2017.1665>
- Weete, J.D., 2012. *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms*. Springer New York.
- Wilkinson, B., Micklefield, J., 2009. Chapter 14. Biosynthesis of nonribosomal peptide precursors. *Methods Enzymol.* 458, 353–378. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04814-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04814-9)

- Winn, M., Fyans, J.K., Zhuo, Y., Micklefield, J., 2016. Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* 33, 317–347. <https://doi.org/10.1039/C5NP00099H>
- Wise, C., Falardeau, J., Hagberg, I., 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, 1036–1041. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0336-R>
- Wyand, R.A., Brown, J.K.M., 2005. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 42, 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.007>
- Xu, X.-M., Gao, L.-Q., Yang, J.-R., 2010. Are insensitivities of *Venturia inaequalis* to myclobutanil and fenbuconazole correlated? *Crop Prot.* 29, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.07.002>
- Xu, X.-M., Murray, R.A., Salazar, J.D., Hyder, K., 2008. The effects of temperature, humidity and rainfall on captan decline on apple leaves and fruit in controlled environment conditions. *Pest Manag. Sci.* 64, 296–307. <https://doi.org/10.1002/ps.1520>
- Xue, J., Sun, L., Xu, H., Gu, Y., Lei, P., 2023. *Bacillus atrophaeus* NX-12 Utilizes Exosmotic Glycerol from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* for Fengycin Production. *J. Agric. Food Chem.* 71, 10565–10574. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01276>
- Yaegashi, H., Hirayama, K., Akahira, T., Ito, T., 2020. Point mutation in *CYP51A1* of *Venturia inaequalis* is associated with low sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *J. Gen. Plant Pathol.* 86, 245–249. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00924-4>
- Yao, J.-L., Xu, J., Cornille, A., Tomes, S., Karunairetnam, S., Luo, Z., Bassett, H., Whitworth, C., Rees-George, J., Ranatunga, C., Snirc, A., Crowhurst, R., de Silva, N., Warren, B., Deng, C., Kumar, S., Chagné, D., Bus, V.G.M., Volz, R.K., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E., Giraud, T., MacDiarmid, R., Gleave, A.P., 2015. A microRNA allele that emerged prior to apple domestication may underlie fruit size evolution. *Plant J.* 84, 417–427. <https://doi.org/10.1111/tpj.13021>
- Yaseen, Y., Gancel, F., Béchet, M., Drider, D., Jacques, P., 2017. Study of the correlation between fengycin promoter expression and its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions and the impact on surfactin production. *Arch. Microbiol.* 199, 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1406-x>
- Yoshida, Y., Aoyama, Y., 1986. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P450 14DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 36, 7. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90694-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90694-0)

- Ypema, H.L., Gold, R.E., 1999. Kresoxim - methyl: Modification of a Naturally Occurring Compound to Produce a New Fungicide. *Plant Dis.* 83, 4–19. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.4>
- Zakharova, A.A., Efimova, S.S., Malev, V.V., Ostroumova, O.S., 2019. Fengycin induces ion channels in lipid bilayers mimicking target fungal cell membranes. *Sci. Rep.* 9, 16034. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52551-5>
- Zhang, L., Sun, C., 2018. Fengycins, Cyclic Lipopeptides from Marine *Bacillus subtilis* Strains, Kill the Plant-Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* by Inducing Reactive Oxygen Species Production and Chromatin Condensation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00445-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>
- Zhang, Y., Crous, P.W., Schoch, C.L., Bahkali, A.H., Guo, L.D., Hyde, K.D., 2011. A molecular, morphological and ecological re-appraisal of Venturiales—a new order of Dothideomycetes. *Fungal Divers.* 51, 249–277. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0141-x>

Annexes

Annexe 1: supplementary datas article 2.

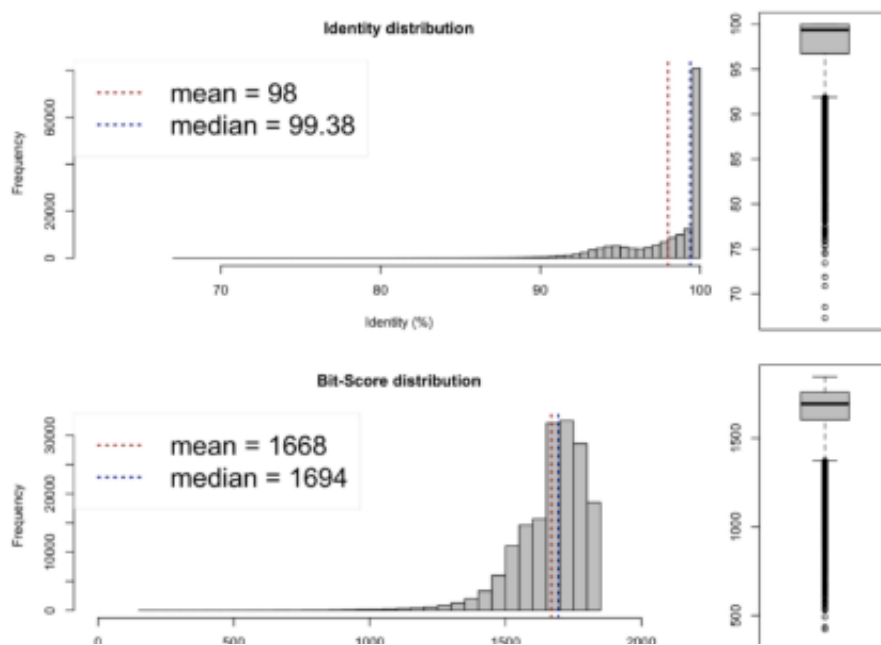


Figure S1: Genetic proximity evaluation by ANI between *Venturia inaequalis* S755 and Rs552 strains.

Figure S2: Lipopeptides mass spectrometry analysis. Red circles and arrow show the main isoform mass and in some example its fragmentation ions. Lipopeptides were analysed using RP-HPLC-QDa.

- Figure S2 A: Lichenysin mass spectrometry analysis (peaks 1 to 4)
- Figure S2 B: Pumilacidin mass spectrometry analysis (peaks 1 to 6)
- Figure S2 C: Iturin A mass spectrometry analysis (peaks 1 to 4)
- Figure S2 D: Mycosubtilin mass spectrometry analysis (peaks 1 to 5)
- Figure S2 E: Fengycin (plipastatin) mass spectrometry analysis (peaks 1 to 9)

Figure S2 A:Lichenysin Mass Spectrometry analysis

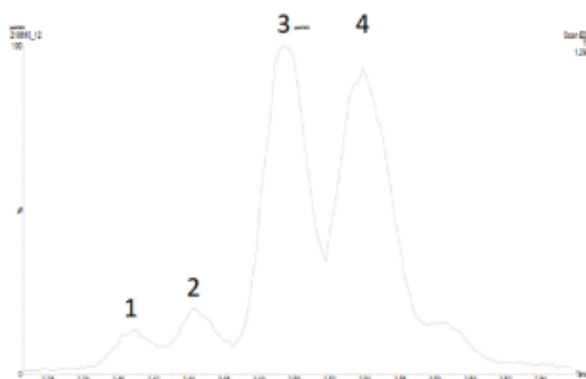


Figure S2 A:Lichenysin Mass Spectrometry analysis

Peak 1: Lichenysin C14 [Val 7]

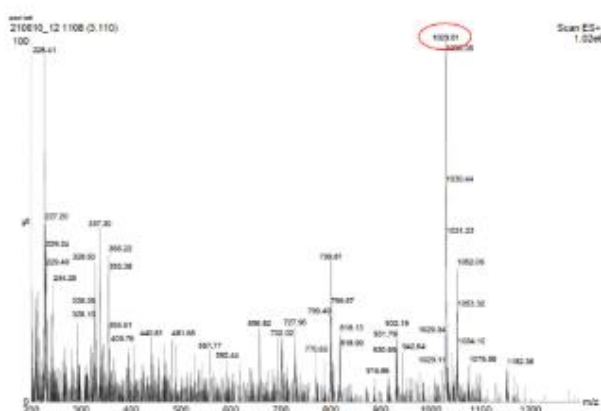


Figure S2 A:Lichenysin Mass Spectrometry analysis

Peak 2: Lichenysin C13 [Leu 7]

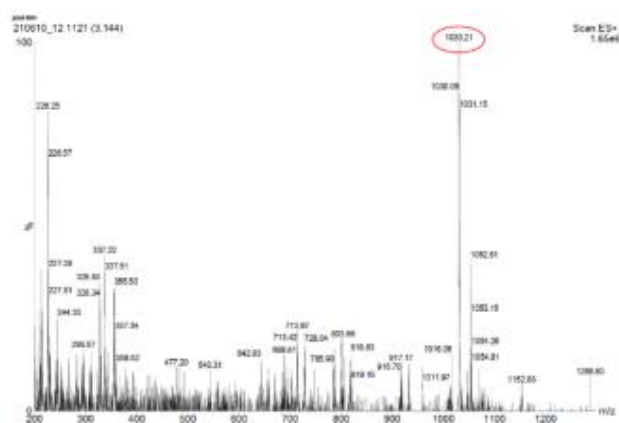


Figure S2 A:Lichenysin Mass Spectrometry analysis
Peak 3: Lichenysin C14 [Leu 7]

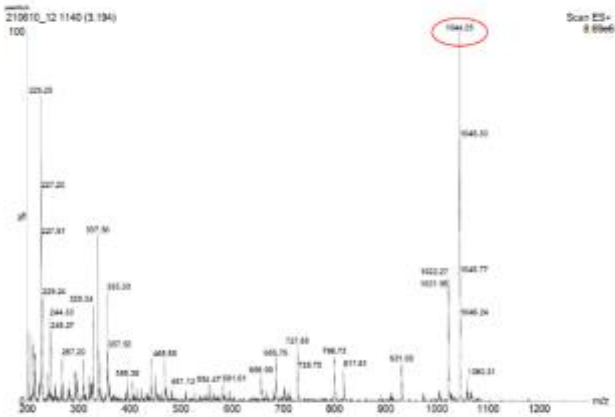
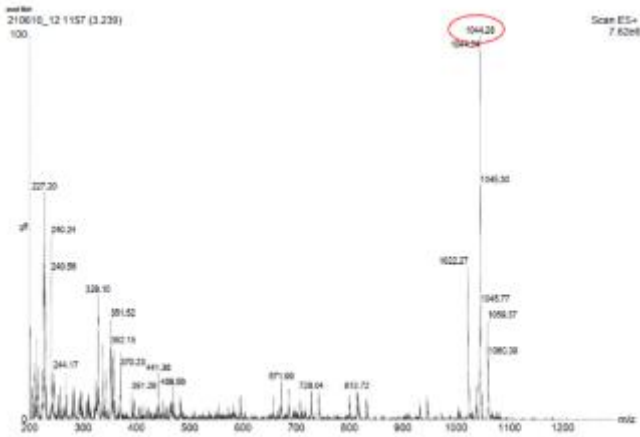


Figure S2 A:Lichenysin Mass Spectrometry analysis
Peak 4: Lichenysin C15 [Val 7]



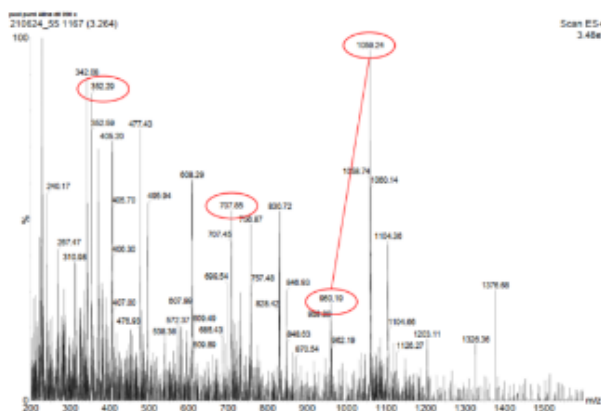
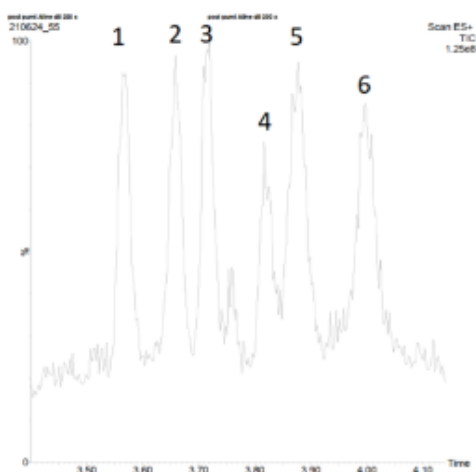


Figure S2 B: Pumilacidin Mass Spectrometry analysis
Peak 2: Pumilacidin C15 [Leu 7]

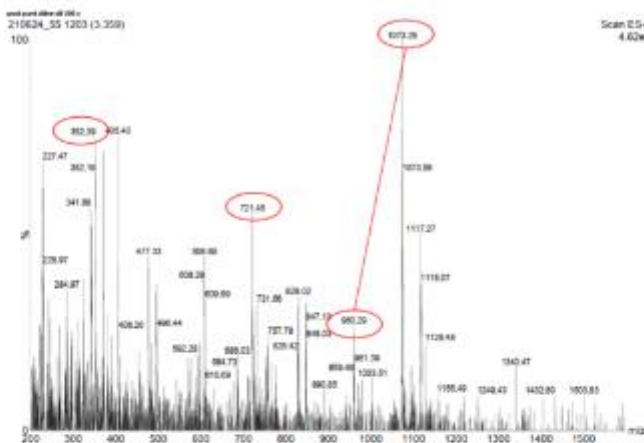


Figure S2 B: Pumilacidin Mass Spectrometry analysis
Peak 4: Pumilacidin C16 [Leu 7]

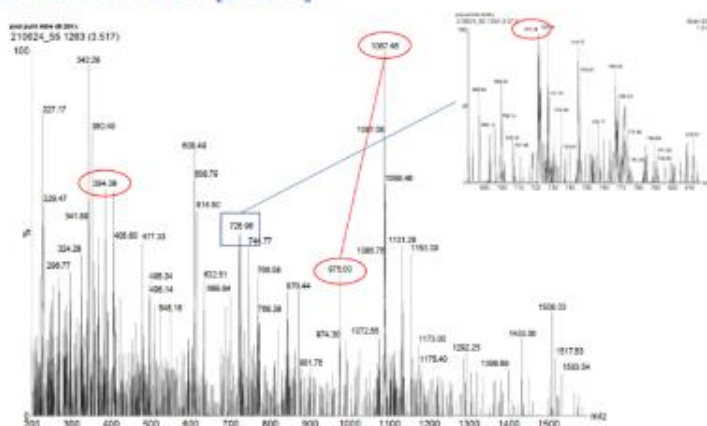


Figure S2 B: Pumilacidin Mass Spectrometry analysis
Peak 5: Pumilacidin C17 [Val 7]

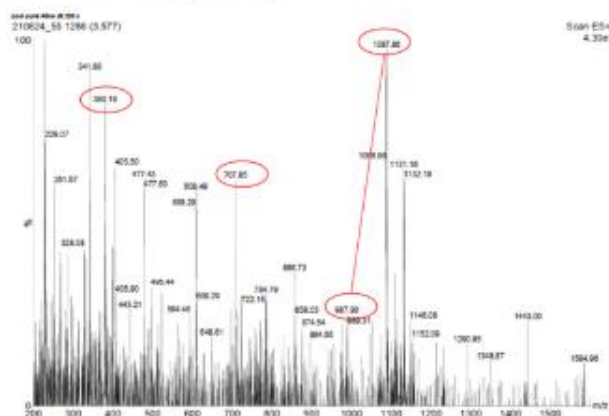


Figure S2 B: Pumilacidin Mass Spectrometry analysis
Peak 6: Pumilacidin C17 [Leu 7]

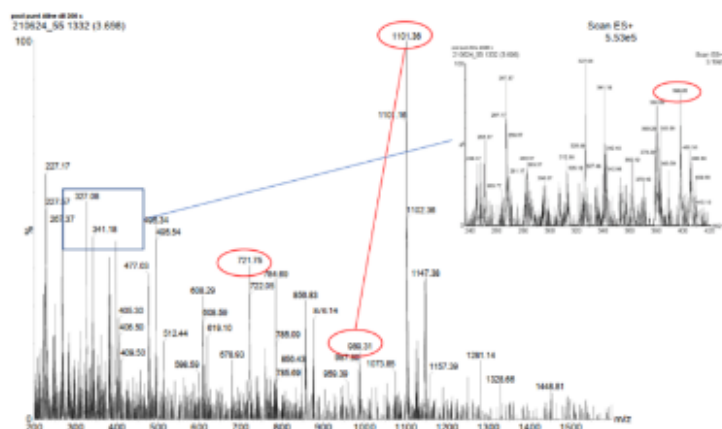


Figure S2 C: Iturin A Mass Spectrometry analysis

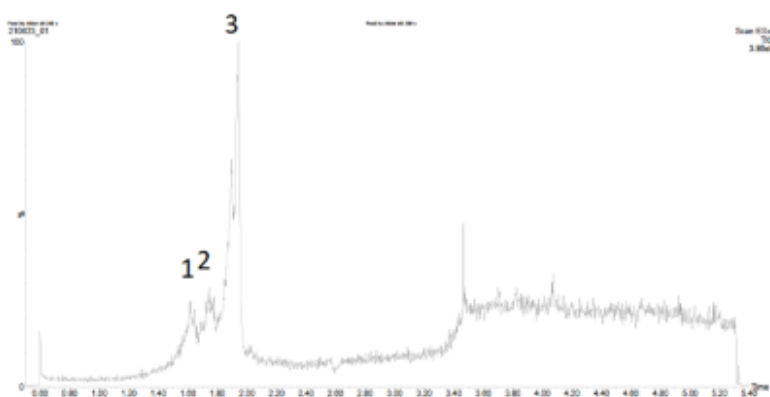


Figure S2 C: Iturin A Mass Spectrometry analysis
Peak 1: Iturin A C14

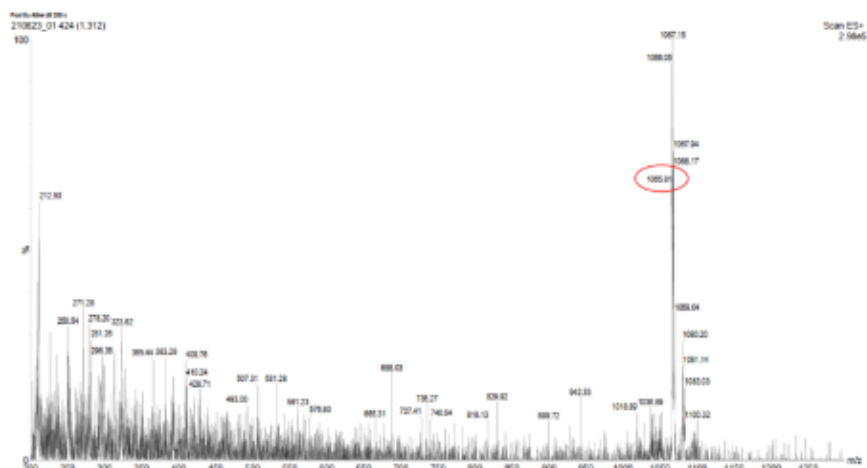


Figure S2 C: Iturin A Mass Spectrometry analysis
Peak 2: Iturin A C15

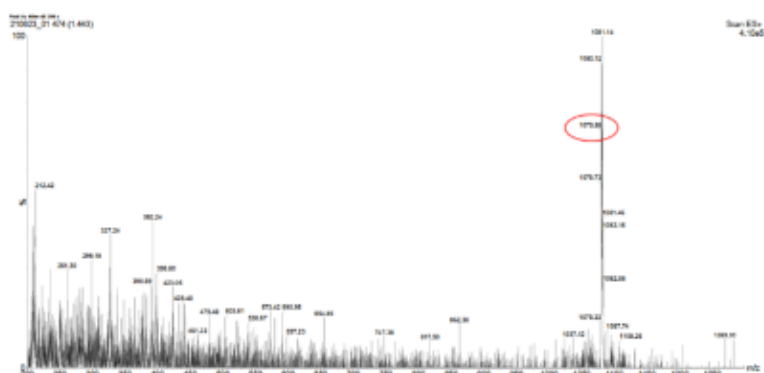


Figure S2 C: Iturin A Mass Spectrometry analysis
Peak 3: Iturin A C16

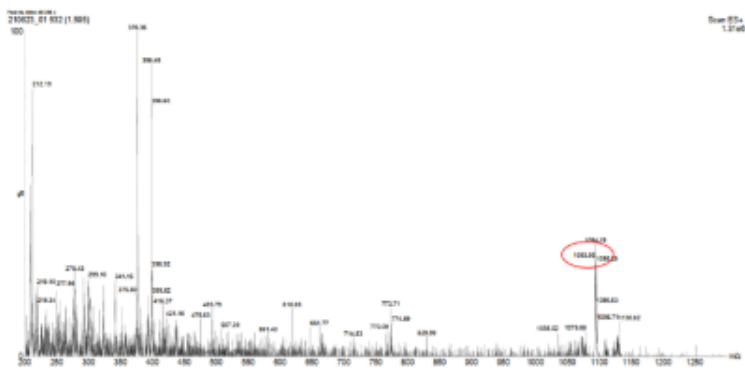


Figure S2 D: Mycosubtilin Mass Spectrometry analysis

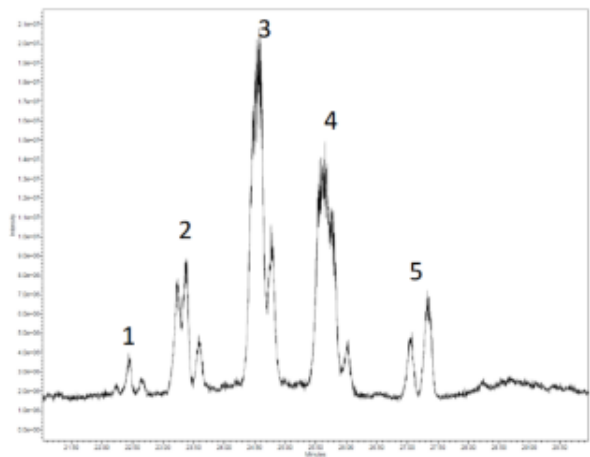


Figure S2 D: Mycosubtilin Mass Spectrometry analysis
Peak 1: Mycosubtilin C14



Figure S2 D: Mycosubtilin Mass Spectrometry analysis
Peak 2: Mycosubtilin C15

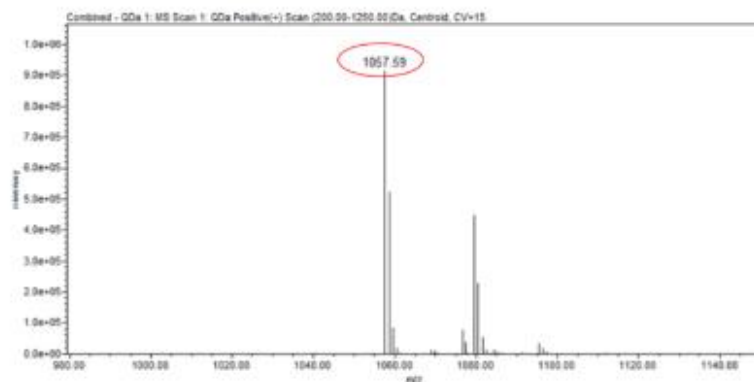


Figure S2 D: Mycosubtilin Mass Spectrometry analysis
Peak 3: Mycosubtilin C16

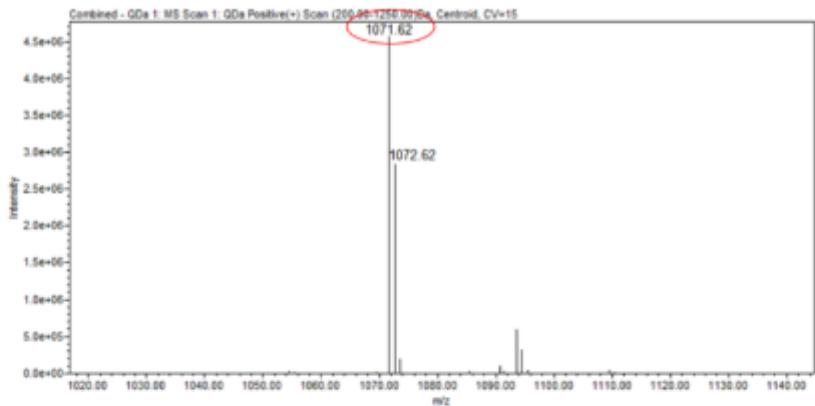


Figure S2 D: Mycosubtilin Mass Spectrometry analysis
Peak 4: Mycosubtilin C17

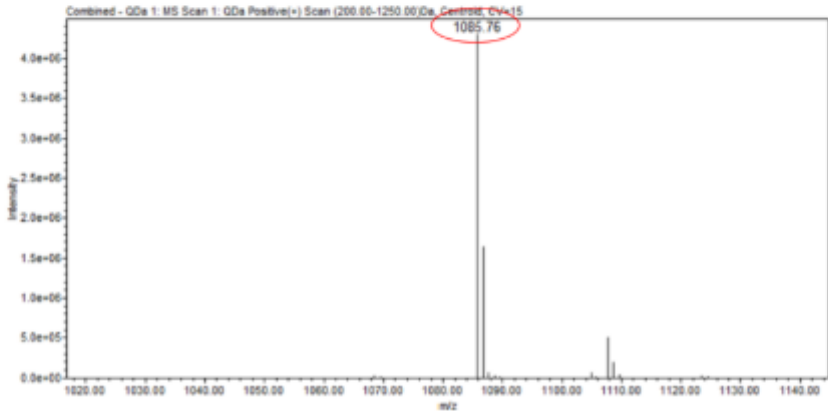


Figure S2 D: Mycosubtilin Mass Spectrometry analysis
Peak 5: Mycosubtilin C18

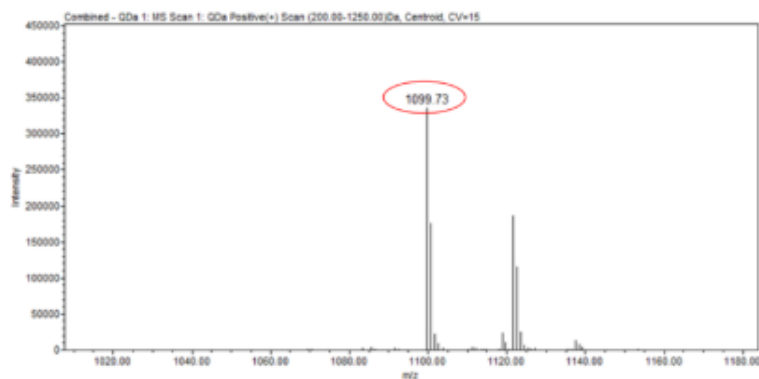


Figure S2 E : Fengycin Mass Spectrometry analysis

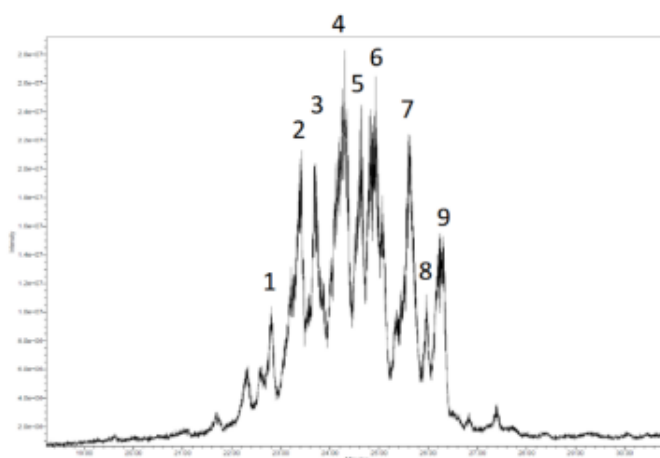


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 1: Plipastatin A C15 (725.59) and Plipastatin A C16 (732.61)

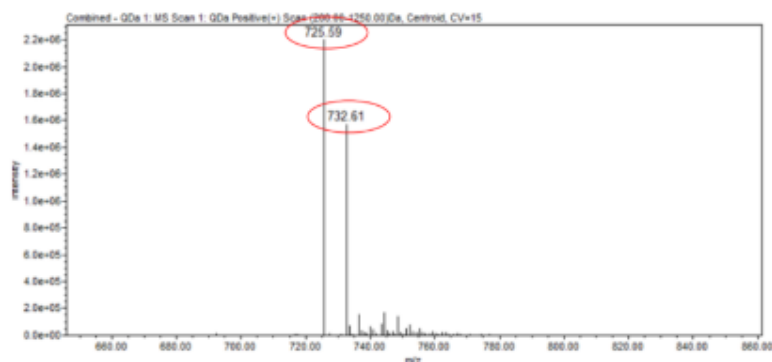


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 2: Plipastatin A C17 or Plipastatin B C15

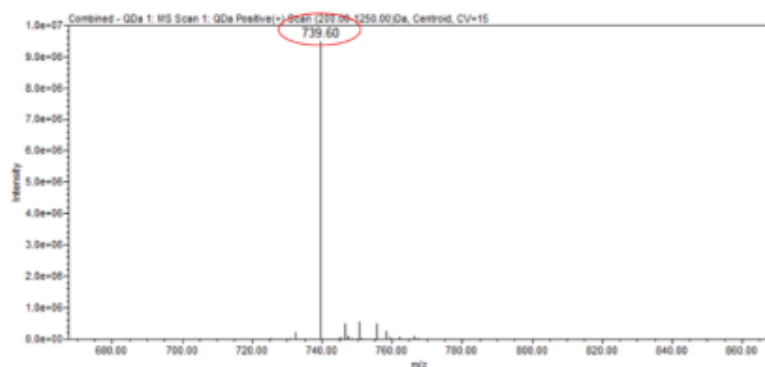


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 3: Plipastatin A C16

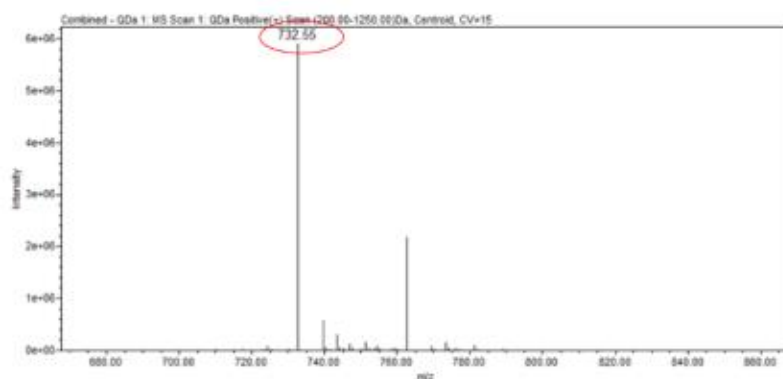


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 4: Plipastatin A C17 or Plipastatin B C15 (739.52)
Plipastatin A C18 or Plipastatin B C16 (746.55)

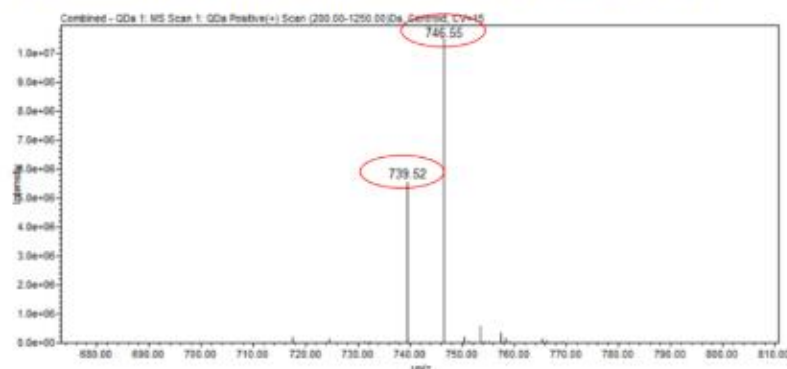


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 5: Plipastatin A C16 (with double bound)

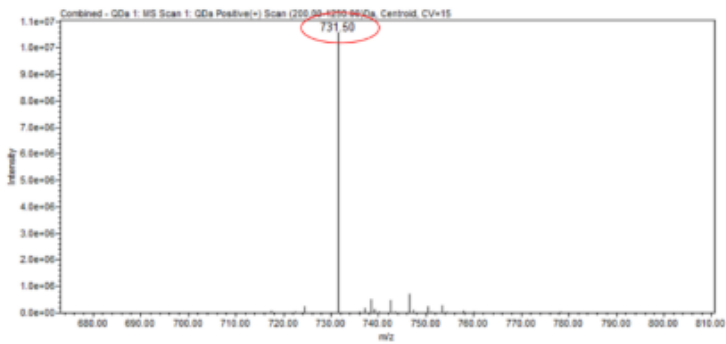


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 6: Plipastatin A C19 or Plipastatin B C17

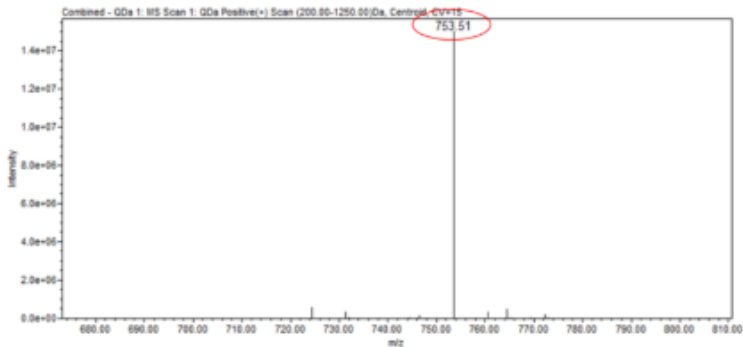


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 7: Plipastatin A C17 or Plipastatin B C15 (with double bond)

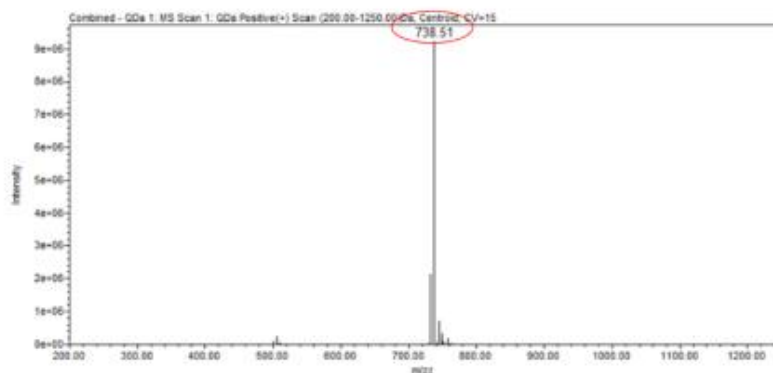


Figure S2 E : Fengycin (plipastatin) Mass Spectrometry analysis
Peak 8: Plipastatin B C18

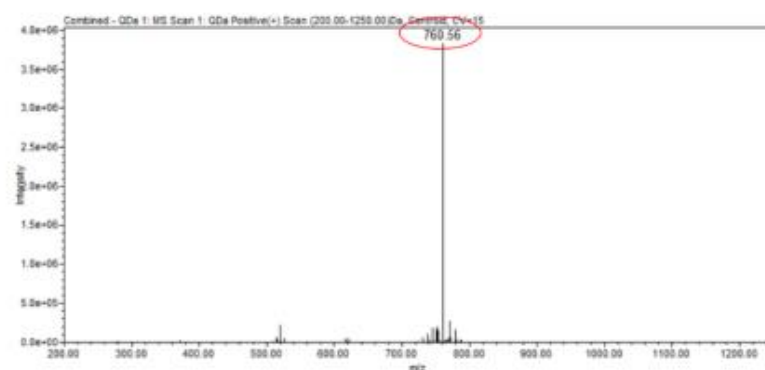


Table S1. Primers used for the amplification and sequencing of the *Cyp51A* gene and upstream region, and the expression analysis of the *Cyp51A* gene.

	Primer		Sequence (5' to 3')	Reference	Amplification target
Amplification and sequencing of the <i>Cyp51A</i> gene	Fragment 1	F	ATACAGACGAGCAACACCACACT	Villani <i>et al.</i> 2016	<i>Cyp51A</i> from -38 to 400bp
		R	CAAACAGAGCCATGTCAACG	Created with Primer3	
	Fragment 2	F	TTTACCTTCATTCTTCTTGGCA	Villani <i>et al.</i> 2016	<i>Cyp51A</i> from 300 to 1200 bp
		R	AGTACGAAGATCTTGCTCGCA	Created with Primer3	
	Fragment 3	F	GACAAAGAAATCGCCACAT	Created with Primer3	<i>Cyp51A</i> from 1080 to 1720 bp
		R	GGTGAACAGCCTGGGAGTT	Created with Primer3	
Amplification and sequencing of the <i>Cyp51A</i> upstream region	Promotor 1	F	GAAACCTAGGTGCAAGAGCAA	Villani <i>et al.</i> 2016	Putative promotor of <i>Cyp51A</i> from -738 to -134bp
		R	TTACCCTGGCCCTGGCTTTGGCTTT	Villani <i>et al.</i> 2016	
	Promotor 2	F	ATCCCTGAATTTGAGAGCACT	Schnabel and jones. 2001	Putative promotor of <i>Cyp51A</i> from -290 to +578bp
		R	ACATAGGATTTGAGAGCTTCGGTGGTGAGAC	Schnabel and Jones. 2001	
Expression of the <i>Cyp51A</i> gene	<i>Cyp51A</i>	F	GAT GGA GCA AAA GAA GTT CGT CA	Villani <i>et al.</i> 2016	<i>Cyp51A</i> gene to determine the relative expression
		R	GAA TTG AGG GTA GCG TTT GGT ATA G	Villani <i>et al.</i> 2016	
	<i>Actin</i>	F	CTACGTGGCCCTTGATTTGCG	Created with Primer3	Actin gene to determine the relative <i>Cyp51A</i> gene expression
		R	GAGTTGAAGGTGGTGACGTG	Created with Primer3	
	<i>GAPDH</i>	F	GGCAAGACCATCCGTTTCTA	Kucheryava <i>et al.</i> 2008	GAPDH gene to determine the relative <i>Cyp51A</i> gene expression
		R	GACACCCATGACGAACATTG	Kucheryava <i>et al.</i> 2008	

Table S2. Comparison of the IC₅₀ values of different antifungal compounds tested against the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. FI, fengycin/iturin A; FL, fengycin/lichenysin; FP, fengycin/pumilacidin.

	S755		Rs552	
	IC ₅₀ (mg/L)	Confidence interval (95%)	IC ₅₀ (mg/L)	Confidence interval (95%)
Fengycin	0.024	[0.017-0.033]	>100	
Mycosubtilin	1.238	[1.049-1.462]	0.947	[0.853-1.052]
Iturin A	3.869	[3.216-4.654]	2.757	[1.717-4.427]
Lichenysin	>100	-	>100	-
Pumilacidin	>100	-	>100	-
FI	0.060	[0.045-0.080]	1.869	[1.614-2.165]
FL	0.047	[0.024-0.092]	8.293	[6.696-10.272]
FP	0.041	[0.026-0.066]	4.273	[3.471-5.261]
Tebuconazole	0.012	[0.010-0.014]	1.153	[1.065-1.248]
Tetraconazole	0.009	[0.008-0.011]	0.907	[0.833-0.988]

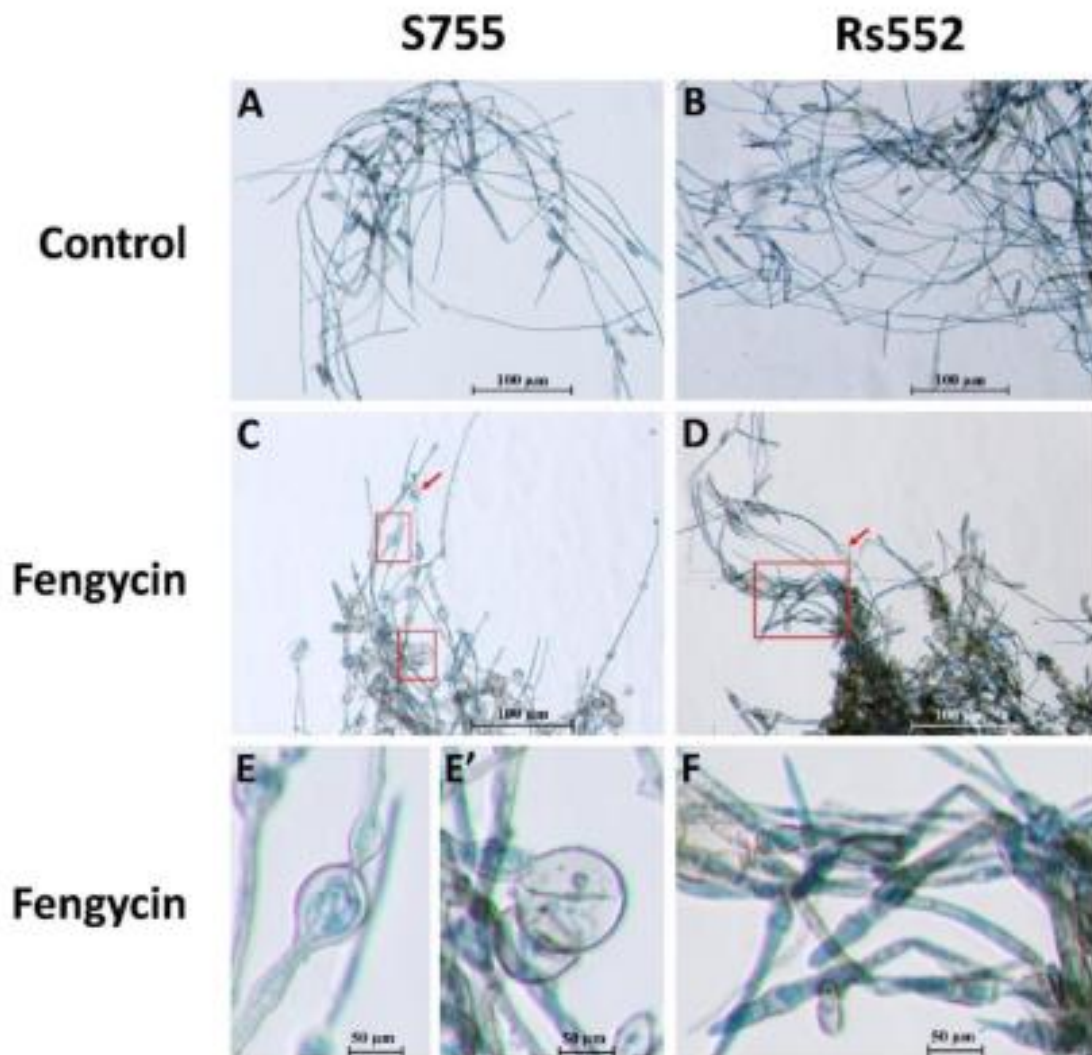


Figure S2: Observations of the mycelium of both *V. inaequalis* strains S755 and Rs552 using photonic microscopy. A, S755 control; B, Rs552 control; C, S755 at 0.021 mg/L fengycin; D, Rs552 at 42 mg/L fengycin; E and E', zoom on vesicles observed in the picture C (rectangle); F, zoom on the mycelium observed in the picture D (rectangle). Red arrows (C,D) point out an example of the observed vesicles.

Table S3. Interaction ratios (IRs) between efflux pump modulators (amitriptyline, chlorpromazine, verapamil) and the fungicides tebuconazole (a), fengycin (b), and tolnaftate (c). The fungicide concentrations chosen are close to the IC₅₀ value of each other strain.

		Efflux pump modulator						
(a)	Strain	Concentration (mg/L)	Amitriptyline		Chlorpromazine		Verapamil	
			4.5	7	4.5	7	4.5	7
Tebuconazole	Rs552	0.008	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0
		0.012	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0
		0.017	1.0	0.9	1.0	1.1	0.9	0.9
	S755	0.8	1.0	1.3	1.4	1.3	0.8	0.8
		1.2	0.8	1.0	1.1	0.9	0.8	0.9
		1.7	1.3	1.4	1.4	1.4	0.8	0.9
(b)	Strain	Concentration (mg/L)	Amitriptyline		Chlorpromazine		Verapamil	
			4.5	7	4.5	7	4.5	7
Fengycin	Rs552	0.01	0.9	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0
		0.02	1.1	1.0	0.9	0.8	1.1	1.2
		0.04	1.0	0.9	1.0	0.8	1.1	1.1
	S755	1	0.9	0.8	1.2	0.4	0.7	1.0
		2	1.0	0.9	1.2	0.5	0.9	1.2
		4	1.0	0.9	1.1	0.5	0.9	1.4
(c)	Strain	Concentration (mg/L)	Amitriptyline		Chlorpromazine		Verapamil	
			4.5	7	4.5	7	4.5	7
Tolnaftate	Rs552	0.125	1.0	0.9	1.0	0.8	0.8	1.0
		0.25	0.9	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0
		0.5	0.9	0.9	1.2	1.6	0.9	1.0
	S755	1.25	1.1	1.4	1.3	1.4	1.2	1.1
		2.5	1.2	1.3	1.0	1.3	1.0	0.9
		5	0.7	1.4	0.8	1.1	0.3	0.3

Table S4. Localization of the ABC- and MFS-encoding genes in S755 and Rs552 genomes, their associated mutations (silent and non-silent) and variations in the upstream region.

References (ACCNUM)	Gene	Presence S755	Accession number	Presence Rs552	Accession number	Silent mutations	Non-silent mutations	Variation in the upstream region	Note
KAE9965227.1 and KAE9980334.1	<i>MFS1</i>	Yes	OR909971	Yes	OR909972	G259(gga-ggg)	-	-	-
AF227914	<i>ABC1</i>	Yes	OR909973	Yes	OR909974	11th base last intron c->a;	S755 I1229->RS552 M1229; S755 V1299->RS552 I1299	285th base in 5' of M1 RS552 insertion t; 360th base in 5' of M1 S755 insertion 8 bases; 542th base in 5' of M1 S755 insertion 17 bases	RS552: 2 contigs -> 333 bases missing in last exon between AA1355 and 1467 between the 2 contigs (assembly gap)
AF227915	<i>ABC2</i>	Yes	OR909975	Yes	OR909976	T518(tat-tac), R527(cgt-cgc), S538(tct-tcg), S546(agt-agc), V573(gta->gtg), L578(tta->tgt), F580(ttt->ttc), 583(ttt->ttc), S591(tct->tcc), Q617(caa->cag), C640(tgc->tgt), V670(gtc->gtt), T689(acg-	RS552D752->S755N752, RS552K846->S755R846, RS552V929->S755I929, RS552S971->S755P971, RS552N1436->S755S1436	-	-

						>act), L690(ttg->tta), F691(ttc->ttt), Y697(tac->tat), F712(ttt->ttc), G718(gga->ggg), L741(ctc->ttg), S744(TCC->TCT), S769(tcg->tca), G787(ggt->ggc), G794(ggt->ggc), A802(gct->gcc), t->c intron, C868(tgt->tgc), Y869(tat->tac), S875(tct->tcc), R879(cgc->cgt), L880(tct->ctt), N882(aac->aat), T894(aca->acg), L896(ctg->cta), A934(gct->gcc), Q936(cag->caa), S961(tct->tca), Y968(tac->tat), V979(gtc->gtt), E1022(gaa->gag), L1027(ctt->ctc), L1067(cta->ctg)R1128(cga->cgg), P1176(ccc->ccg), Q1188(cag->caa), P1196(cca->ccc), F1204(ttt->ttc), c->t, t->c, a->c intron,			
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

						E1249(gag->gaa), A1255(gct->gcc), 1310(ggc->ggg), V1359((gtt->gta), D1392(agg->agt), 1393(ctc->ctg)S1435(agg->agt), G1464(ggt->ggc), L1477(ttg->ctg)			
AF375878	ABC3	Yes	OR909977	Yes incomplete	OR909978	N233(ttg->tta), A924(cga->cgc), Y936(ata->atg), L967(gaa->gag), A970(cgc->cgt), Q979(gtt->gtc), I980(tag->taa), V994(cat->cac), S1057(tca->tcg), P1061(ggt->ggg), V1086(caa->cag), G1097(cct->ccg), R1218(gcc->gca)D1235(ctg->cta),	S755A977->RS552S977, S755S1051->RS552N1051,	no RS552 promoter but short 5' part of S755 identical to reference gene	missing first 5 amino acids and promoter sequence

AF375879	ABC4	Yes	OR909979	Yes incomplete	OR909980	S121(agt->agc), intron1 2nt, V460(gtc->gta), G472(ggg->gga), V489(gtt->gtg), L524(ctc->ctt), F542(ttt->ttc), R556(agg->aga), G563(ggg->ggc), R588(aga->cga), R599(cgc->cga), A605(gcg->gca), 4nt intron2, G628(ggt->ggc), T720(acg->aca), L766(ctg->ttg), L768(ctc->cta), E779(gag->gaa), N797(aat->aac), P798(cct->cca), S842(agg->agt), T852(tat->tac), 2nt intron3, S913(tca->tcg), C934(tgc->tgt), T979(act->acc), A1027(gca->gct), L1028(tta->ttg), F1065(ttt->ttc), L1116/1131(ctt->ctc), D1155/1170(gat->gac), R1186/1201(agg->cgg)E1202/1217 (gag->gaa),	S755A757- >RS552T757, S755S816- >RS552A816,	170th and 213th base in 5' of M1 Rs552 inversion t- >a ans a->c. At the 201th base in 5' of M1 Rs552 insertion of 3 nucleotides.	-
----------	------	-----	----------	-------------------	----------	--	--	--	---

Table S5. Percentage of sterol and phospholipid composition in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. PG, Phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine, PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; LPE, lysophosphatidylethanolamine. The presence of an asterisk indicates a significant difference among the two strains according to a one factor ANOVA test. $\alpha_{\text{adjusted}} = 0.007$.

	S755		Rs552	
	Average (%)	Standard deviation	Average (%)	Standard deviation
Squalene	7.27	4.45	1.48	0.34
Ergosta-5,8-dien-3-ol	48.57	5.2	52.65	1.04
Ergosta-7,22-dien-3-ol*	16.28	1.25	21.06	0.32
Ergosta-5,24-dien-3-ol	6.08	1.09	7.24	0.8
PG	0.41	0.12	0.60	0.15
PI	46.00	4.44	46.69	5.68
PS	2.42	0.88	1.51	0.62
PC	13.01	2.3	11.97	2.28
LPC	4.20	0.58	4.92	0.67
PE	33.02	3.09	32.97	4.5
LPE	0.94	0.09	1.34	0.19
PG(16:0/18:1)	17.59	1.27	11.75	2.25
PG(16:0/18:2)	19.09	2.38	22.66	3.93
PG(16:0/18:3)	0.98	0.27	1.38	0.11
PG(16:1/18:1)	1.00	0.03	1.02	0.41
PG(16:1/18:2)	1.10	0.09	1.35	0.33
PG(18:0/18:2)	1.15	0.12	1.85	0.33
PG(18:1/18:1)	7.37	1.95	6.27	2.43
PG(18:1/18:2)	19.00	2.24	15.32	3.95
PG(18:1/18:3)	2.80	0.41	1.82	0.64
PG(18:2/18:2)	18.78	1.8	17.96	1.27
PG(18:2/18:3)	4.19	0.91	3.38	0.57
PI(16:0/18:1) *	23.50	1.72	16.95	0.42
PI(16:0/18:2)	20.37	4.57	30.21	2.38
PI(18:0/18:1)	10.96	1.27	9.16	0.85
PI(18:0/18:2)	13.37	2.6	15.96	0.9
PI(18:1/18:1)	11.29	2.76	7.41	0.34
PI(18:1/18:2)	11.76	1.88	10.61	0.48

PI(18:2/18:2)	3.71	0.41	4.40	0.45
PS(16:0/18:1)	21.60	4.21	15.49	1.25
PS(16:0/18:2)	21.33	1.64	33.99	3.64
PS(16:0/18:3)	1.31	0.32	1.59	0.47
PS(18:0/18:2)	12.53	3.36	6.82	5.96
PS(18:1/18:2)	11.01	2.87	12.06	1.02
PS(18:1/20:1)	2.69	2.49	1.39	1.25
PS(18:1/20:2)	1.68	1.34	1.39	0.48
PS(18:2/18:2)	5.45	1.56	8.22	1.54
PS(18:2/18:3)	0.97	0.85	0.75	0.16
PS(18:2/20:1)	1.16	1.02	1.31	0.62
PS(18:2/20:2)	2.12	1.19	2.39	0.21
PC(16:0/18:1)	7.67	1.16	7.18	0.74
PC(16:0/18:2)	9.65	1.54	12.17	0.28
PC(16:0/18:3)	1.28	0.2	1.52	0.17
PC(16:1/18:1)	2.46	0.21	2.52	0.37
PC(16:1/18:2)	2.12	0.46	3.19	0.2
PC(16:2/18:2)	0.58	0.2	1.51	0.38
PC(18:0/18:1)	1.07	0.27	1.62	0.32
PC(18:0/18:2)	1.45	0.22	2.04	0.33
PC(18:1/18:1)	21.44	3.3	14.65	0.73
PC(18:1/18:2)	23.10	2.49	18.72	0.59
PC(18:1/18:3)	4.21	0.36	2.92	0.31
PC(18:2/18:2)	14.66	3.59	18.82	1.55
PC(18:2/18:3)	5.23	1.57	6.58	0.46
LPC(16:0) *	0.13	0.23	1.49	0.14
LPC(18:0) *	4.84	0.42	10.35	1.4
LPC(18:1)	59.72	2.54	52.53	1.47
LPC(18:2)	30.82	2.88	31.46	0.54
LPC(18:3)	3.81	0.38	3.13	0.32
PE(16:0/18:1)	8.06	0.71	6.80	0.16
PE(16:0/18:2)	5.86	1.18	8.92	0.42
PE(16:0/18:3)	0.72	0.14	1.15	0.03
PE(18:0/18:1)	4.00	0.29	3.42	0.49
PE(18:0/18:2)	4.98	1.36	5.94	0.13
PE(18:1/18:1)	18.51	3.17	12.45	1.4
PE(18:1/18:2)	19.22	0.64	17.33	1.75
PE(18:1/18:3)	2.90	0.26	2.39	0.21

PE(18:1/20:1)	6.23	2.15	4.83	0.89
PE(18:1/20:2)	3.27	0.44	2.43	0.35
PE(18:2/18:2)	8.67	2.71	12.50	1.43
PE(18:2/18:3)	2.87	0.94	4.17	0.44
PE(18:2/20:1)	3.57	0.45	2.79	0.82
PE(18:2/20:2)	3.76	1.36	5.33	1.68
LPE(16:0) *	2.65	0.39	7.45	1.29
LPE(18:0)	14.68	2.03	24.76	3.59
LPE(18:1) *	55.35	4.56	37.91	1.45
LPE(18:2)	22.59	12.58	24.24	3.54
LPE(18:3)	2.62	0.56	3.15	0.37

Contri

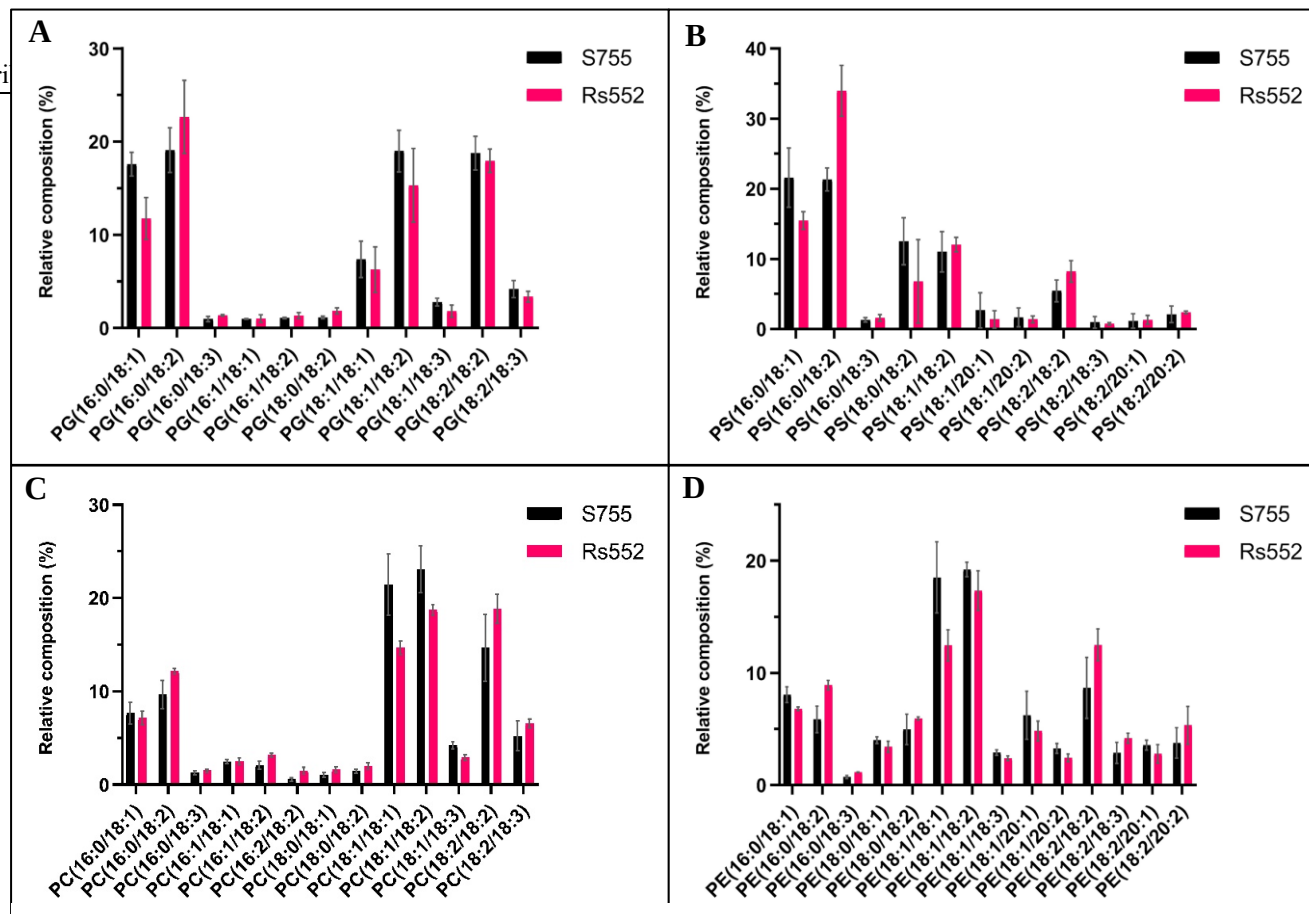


Figure S4: Total phospholipids in the two *V. inaequalis* strains S755 and Rs552. **A**, comparison of the relative composition (%) of phosphatidylglycerol (PG); **B**, comparison of the relative composition (%) of phosphatidylserine (PS); **C**, comparison of the relative composition (%) of phosphatidylcholine (PC); **D**, comparison of the relative composition (%) of phosphatidylethanolamine (PE). Bars represent means and error bars standard deviation. No letters indicates no significant differences among the two strains according to the ANOVA one factor – Tukey test (with a α adjusted to = 0.007); n=3.

Annexe 2 : Comparaison des valeurs CI_{50} de différents composés antifongiques testés contre les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. FI, fengycine/iturine A ; FS, fengycine/surfactine ; FL, fengycine/lichénysine ; FP, fengycine/pumilacidine ; NC, non calculable.

	S755		Rs552	
	CI_{50} (mg.L ⁻¹)	Intervalle de confiance (95%)	CI_{50} (mg.L ⁻¹)	Intervalle de confiance (95%)
<i>Fengycine</i>	0,024	[0,016-0,034]	NC	
<i>Mycosubtiline</i>	1,238	[0,854-1,794]	0,947	[0,654-1,372]
<i>Iturine A</i>	3,869	[2,670-5,605]	2,757	[1,903-3,994]
<i>Surfactine</i>	4,259	[2,940-6,171]	17,919	[12,367-25,961]
<i>Pumilacidine</i>	NC		NC	
<i>Lichénysine</i>	NC		NC	
<i>FI</i>	0,060	[0,041-0,087]	1,869	[1,290-2,708]
<i>FS</i>	0,045	[0,031-0,065]	27,242	[18,802-39,469]
<i>FP</i>	0,041	[0,029-0,060]	4,273	[2,949-6,191]
<i>FL</i>	0,047	[0,033-0,068]	8,293	[5,724-12,016]
<i>Tébuconazole</i>	0,012	[0,008-0,017]	1,153	[0,796-1,671]
<i>Tétraconazole</i>	0,009	[0,006-0,013]	0,907	[0,626-1,315]

Annexe 3 : Pourcentage et quantité de la composition en stérols et en acides gras totaux, en phospholipides et en triglycérides dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PS, phosphatidylsérine, PC, phosphatidylcholine ; LPC, lysophosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; LPE, lysophosphatidyléthanolamine ; TG, triglycéride. La présence d'un astérisque indique une différence significative dans la composition relative et la présence d'un hashtag une différence significative dans la composition quantitative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$.

	S755		RS552		S755		RS552	
	Relatif				Quantitatif			
	Pourcentage (%)	Ecart-type	Pourcentage (%)	Ecart-type	Quantité (µg de lipide/mg de champignon poids sec)	Ecart-type	Quantité (µg de lipide/mg de champignon poids sec)	Ecart-type
Squalène	7.27	4.45	1.48	0.34	0.46	0.30	0.10	0.03
Ergosta-5,8-dien-3-ol	48.57	5.2	52.65	1.04	0.38	0.07	0.46	0.05
Ergosta-7,22-dien-3-ol*	16.28	1.25	21.06	0.32	2.93	0.09	3.29	0.47
Ergosta-5,24-dien-3-ol	6.08	1.09	7.24	0.8	1.04	0.13	1.33	0.16
Somme					6.21	0.62	6.27	0.71
C16:0 **	22.96	0.58	17.93	0.92	6.21	0.60	3.20	0.07
C18:0	10.04	0.28	9.75	0.23	2.75	0.29	1.75	0.12
C18:1 **	43.64	1.70	35.24	0.69	11.78	1.45	6.29	0.34
C18:2 *	23.35	2.01	37.08	1.68	6.26	0.13	6.69	0.72
Somme					27.01	2.27	17.93	1.24
PC	13.01	2.3	11.97	2.28	12.53	1.28	12.05	2.05
LPC	4.2	0.58	4.92	0.67	4.11	0.90	4.94	0.51

PE	33.02	3.09	32.97	4.5	32.11	4.49	33.20	4.24
LPE	0.94	0.09	1.34	0.19	0.91	0.11	1.35	0.19
PG	0.41	0.12	0.6	0.15	0.39	0.08	0.60	0.07
PI	46	4.44	46.69	5.68	44.69	5.56	48.86	18.22
PS	2.42	0.88	1.51	0.62	2.39	1.06	1.64	1.04
Somme					97.14	7.84	102.64	24.87
PC(16:0/18:1)	7.67	1.16	7.18	0.74	0.93	0.08	0.86	0.22
PC(16:0/18:2)	9.65	1.54	12.17	0.28	1.19	0.31	1.44	0.28
PC(16:0/18:3)	1.28	0.2	1.52	0.17	0.16	0.04	0.18	0.04
PC(16:1/18:1)	2.46	0.21	2.52	0.37	0.30	0.03	0.30	0.08
PC(16:1/18:2)	2.12	0.46	3.19	0.2	0.26	0.08	0.38	0.08
PC(16:2/18:2)	0.58	0.2	1.51	0.38	0.07	0.03	0.17	0.04
PC(18:0/18:1)	1.07	0.27	1.62	0.32	0.13	0.02	0.20	0.07
PC(18:0/18:2)	1.45	0.22	2.04	0.33	0.18	0.02	0.25	0.08
PC(18:1/18:1)	21.44	3.3	14.65	0.73	2.70	0.28	1.79	0.29
PC(18:1/18:2)	23.1	2.49	18.72	0.59	2.90	0.16	2.29	0.43
PC(18:1/18:3) #	4.21	0.36	2.92	0.31	0.53	0.01	0.35	0.03
PC(18:2/18:2)	14.66	3.59	18.82	1.55	1.87	0.62	2.28	0.34
PC(18:2/18:3)	5.23	1.57	6.58	0.46	0.67	0.26	0.80	0.14
Somme					12.53	1.28	12.05	2.05
LPC(16:0) *#	0.13	0.23	1.49	0.14	0.01	0.01	0.07	0.00
LPC(18:0) *#	4.84	0.42	10.35	1.4	0.20	0.04	0.51	0.03
LPC(18:1)	59.72	2.54	52.53	1.47	2.44	0.59	2.58	0.34
LPC(18:2)	30.82	2.88	31.46	0.54	1.24	0.26	1.54	0.15
LPC(18:3)	3.81	0.38	3.13	0.32	0.15	0.02	0.15	0.03

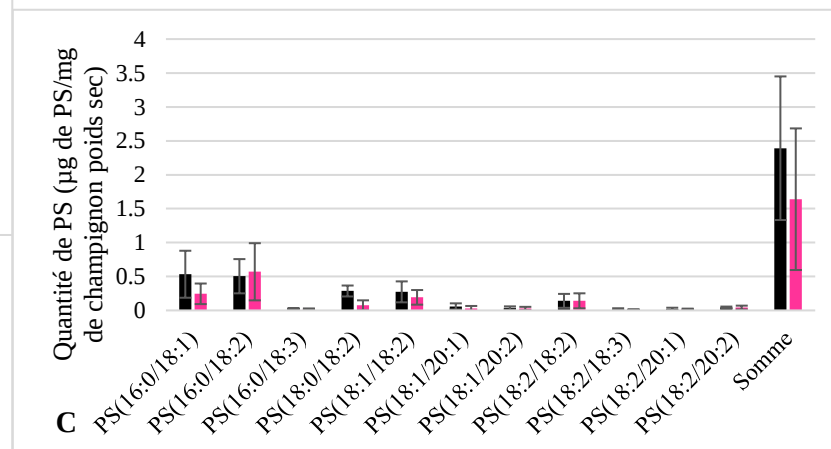
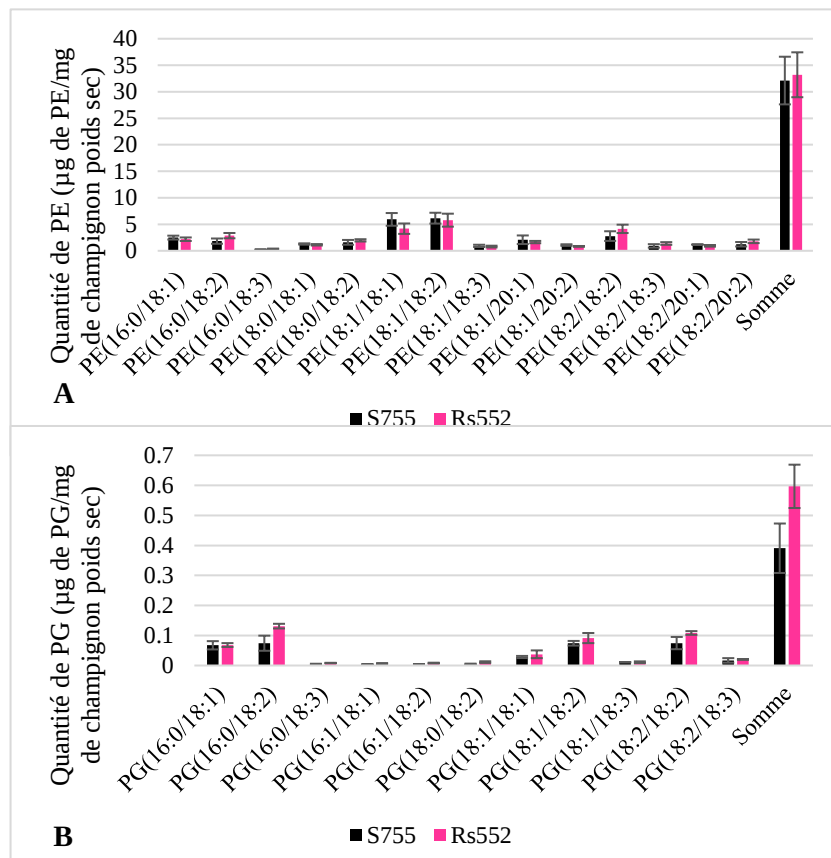
Contribution à la compréhension du mode d'action des lipopeptides contre *V. inaequalis*

Somme					4.06	0.89	4.90	0.50
PE(16:0/18:1)	8.06	0.71	6.8	0.16	2.49	0.36	2.18	0.33
PE(16:0/18:2)	5.86	1.18	8.92	0.42	1.82	0.50	2.86	0.50
PE(16:0/18:3)	0.72	0.14	1.15	0.03	0.22	0.07	0.37	0.05
PE(18:0/18:1)	4	0.29	3.42	0.49	1.28	0.12	1.13	0.14
PE(18:0/18:2)	4.98	1.36	5.94	0.13	1.60	0.45	1.97	0.22
PE(18:1/18:1)	18.51	3.17	12.45	1.4	5.92	1.20	4.17	0.98
PE(18:1/18:2)	19.22	0.64	17.33	1.75	6.16	1.02	5.78	1.22
PE(18:1/18:3)	2.9	0.26	2.39	0.21	0.93	0.21	0.79	0.16
PE(18:1/20:1)	6.23	2.15	4.83	0.89	2.08	0.81	1.65	0.22
PE(18:1/20:2)	3.27	0.44	2.43	0.35	1.08	0.15	0.83	0.08
PE(18:2/18:2)	8.67	2.71	12.5	1.43	2.77	0.91	4.14	0.79
PE(18:2/18:3)	2.87	0.94	4.17	0.44	0.92	0.33	1.38	0.25
PE(18:2/20:1)	3.57	0.45	2.79	0.82	1.17	0.02	0.94	0.15
PE(18:2/20:2)	3.76	1.36	5.33	1.68	1.23	0.42	1.78	0.33
Somme					32.11	4.49	33.20	4.24
LPE(16:0) *#	2.65	0.39	7.45	1.29	0.02	0.00	0.10	0.02
LPE(18:0)	14.68	2.03	24.76	3.59	0.13	0.00	0.34	0.08
LPE(18:1) *	55.35	4.56	37.91	1.45	0.51	0.10	0.51	0.07
LPE(18:2)	22.59	12.58	24.24	3.54	0.20	0.01	0.33	0.07
LPE(18:3)	2.62	0.56	3.15	0.37	0.02	0.00	0.04	0.01
Somme					0.91	0.11	1.35	0.20
PG(16:0/18:1)	17.59	1.27	11.75	2.25	0.07	0.01	0.07	0.01
PG(16:0/18:2)	19.09	2.38	22.66	3.93	0.07	0.03	0.13	0.01
PG(16:0/18:3)	0.98	0.27	1.38	0.11	0.00	0.00	0.01	0.00

PG(16:1/18:1)	1	0.03	1.02	0.41	0.00	0.00	0.01	0.00
PG(16:1/18:2)	1.1	0.09	1.35	0.33	0.00	0.00	0.01	0.00
PG(18:0/18:2)	1.15	0.12	1.85	0.33	0.00	0.00	0.01	0.00
PG(18:1/18:1)	7.37	1.95	6.27	2.43	0.03	0.00	0.04	0.01
PG(18:1/18:2)	19	2.24	15.32	3.95	0.07	0.01	0.09	0.02
PG(18:1/18:3)	2.8	0.41	1.82	0.64	0.01	0.00	0.01	0.00
PG(18:2/18:2)	18.78	1.8	17.96	1.27	0.07	0.02	0.11	0.01
PG(18:2/18:3)	4.19	0.91	3.38	0.57	0.02	0.01	0.02	0.00
Somme					0.39	0.08	0.60	0.07
PI(16:0/18:1) *	23.5	1.72	16.95	0.42	10.38	1.99	8.17	3.17
PI(16:0/18:2)	20.37	4.57	30.21	2.38	8.77	1.00	14.35	4.75
PI(18:0/18:1)	10.96	1.27	9.16	0.85	5.01	1.11	4.61	2.00
PI(18:0/18:2)	13.37	2.6	15.96	0.9	5.96	0.47	7.92	3.02
PI(18:1/18:1)	11.29	2.76	7.41	0.34	5.21	1.84	3.71	1.57
PI(18:1/18:2)	11.76	1.88	10.61	0.48	5.38	1.47	5.29	2.14
PI(18:2/18:2)	3.71	0.41	4.4	0.45	1.67	0.19	2.16	0.74
Somme					44.69	5.56	48.85	18.20
PS(16:0/18:1)	21.6	4.21	15.49	1.25	0.53	0.35	0.25	0.15
PS(16:0/18:2)	21.33	1.64	33.99	3.64	0.50	0.25	0.57	0.42
PS(16:0/18:3)	1.31	0.32	1.59	0.47	0.03	0.00	0.02	0.01
PS(18:0/18:2)	12.53	3.36	6.82	5.96	0.29	0.08	0.07	0.07
PS(18:1/18:2)	11.01	2.87	12.06	1.02	0.27	0.15	0.19	0.11
PS(18:1/20:1)	2.69	2.49	1.39	1.25	0.06	0.04	0.03	0.04
PS(18:1/20:2)	1.68	1.34	1.39	0.48	0.04	0.02	0.03	0.03
PS(18:2/18:2)	5.45	1.56	8.22	1.54	0.14	0.10	0.14	0.11

Contribution à la compréhension du mode d'action des lipopeptides contre *V. inaequalis*

PS(18:2/18:3)	0.97	0.85	0.75	0.16	0.02	0.01	0.01	0.01
PS(18:2/20:1)	1.16	1.02	1.31	0.62	0.02	0.02	0.02	0.01
PS(18:2/20:2)	2.12	1.19	2.39	0.21	0.04	0.01	0.04	0.03
Somme					2.39	1.06	1.64	1.04
TG(50:1) *	5.64	0.14	2.70	0.31	7.96	1.19	3.70	0.94
TG(52:1) *	5.50	0.38	2.81	0.29	8.06	1.60	3.98	0.94
TG(54:1) *	1.75	0.03	0.95	0.21	2.63	0.41	1.42	0.54
TG(50:2)	3.47	0.35	2.91	0.18	5.59	1.28	4.48	0.63
TG(52:2)	15.53	1.11	11.11	0.81	25.62	4.57	17.73	3.68
TG(54:2)	7.35	1.23	6.03	0.24	12.60	3.49	9.84	1.55
TG(52:3)	10.60	0.53	11.87	1.19	15.34	1.55	16.82	4.15
TG(54:3)	12.51	0.44	12.24	1.23	18.84	3.22	17.75	3.66
TG(52:4)	5.64	0.59	7.95	1.12	8.10	0.55	11.38	3.58
TG(54:4)	11.17	1.02	12.17	0.62	16.61	1.39	17.74	4.10
TG(52:5)	1.64	0.15	2.19	0.13	2.36	0.24	3.07	0.54
TG(54:5)	8.07	0.52	10.15	0.55	12.10	2.28	14.73	3.25
TG(54:6)	3.92	0.71	6.37	0.16	5.75	0.32	9.22	1.95
TG(54:7) *	1.37	0.25	2.53	0.20	2.00	0.11	3.63	0.69
Somme					152.64	21.57	147.13	28.22
TG FA(16:0)	21.79	0.39	17.45	1.20	28.30	3.87	22.10	5.23
TG FA(18:0)	12.45	1.33	10.87	0.16	17.78	3.68	14.94	2.69
TG FA(18:1)	37.42	2.00	33.16	0.84	52.95	9.25	45.23	8.08
TG FA(18:2) *	21.17	1.19	29.39	0.60	29.51	2.73	39.96	8.24
TG FA(18:3)	5.51	0.60	6.94	0.42	7.59	0.41	9.28	1.32
Somme					138.57	19.34	134.67	25.92



Annexe 4 : Phospholipides totaux dans les deux souches de *V. inaequalis* S755 et Rs552. A, comparaison de la quantité de phosphatidyléthanolamine (PE) ; B, de phosphatidylglycérol (PG), C, de phosphatidylsérine (PS). Les barres représentent les moyennes et les barres d'erreurs l'écart-type standard. L'absence de lettres indique une absence de différence significative entre les deux souches selon les résultats de l'ANOVA un facteur – Tukey test avec un risque α ajusté à $0,05/14 = 0,0035$; $n = 3$.

Annexe 5 : Expériences complémentaires. Pré-traitement et extraction des membranes plasmiques.

Pré-traitement pour lyse cellulaire

Dans l'optique d'analyser les lipides des membranes plasmiques, l'extraction de celles-ci est nécessaire. Après une production de biomasse et la récolte (décrit dans l'article chapitre 3), un pré-traitement est nécessaire pour déstructurer les pellets du champignon. Plusieurs pré-traitements ont été testés pour déterminer le meilleur moyen de déstructurer les pellets. Les différentes techniques utilisées sont le broyage par billes lisses et fines ou à forme de cailloux, par mixage à l'ultraturax, par ultrasons ou par pressage avec une presse de french. Les différentes techniques ont été testées de manière isolée et combinée (Tableau 1) dans du tampon A (composé de 50 mM, 2,5 mM EDTA et 1 mM PMSF). Pour chaque condition un prélèvement de cinq μL a été fixé dans cinq μL de lactophénol pour faire des observations microscopiques.

Tableau 1: Techniques et paramètres testés pour les pré-traitements

Masse de biomasse (g)	Volume de tampon A (mL)	Pré-traitement	Paramètres
1	0,5	Billes A (bille lisse et fine)	40 sec à 6 m/sec
1	0,5	Billes C (forme de cailloux)	40 sec à 6 m/sec
4	10	Ultraturax	30 sec à 16000 rpm/min
4	10	Ultraturax + ultrasons	30 sec à 16000 rpm/min + 5 min à 300 W
4	10	Ultraturax + presse de french	30 sec à 16000 rpm/min + 2000 bar
4	10	Ultraturax + ultrasons + presse de french	30 sec à 16000 rpm/min + 5 min à 300 W + 2000 bar
4	10	Ultraturax + presse de french + billes A	30 sec à 16000 rpm/min + 2000 bar + 40 sec à 6 m/sec
4	10	Ultraturax + presse de french + billes C	30 sec à 16000 rpm/min + 2000 bar + 40 sec à 6 m/sec

Extraction des membranes plasmiques

L'extraction a suivi le protocole de Löffler *et al.*, (2000). Après le pré-traitement, l'ensemble de la lyse a été centrifugé 10 min à 5000 g. Le surnageant a été repris et centrifugé 1h à 30000 g. Puis le culot a été repris dans 14 mL de tampon B composé de 10 mM de Tris, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF et 20% glycérol. Les 14 mL ont été déposés sur deux phases de saccharose (53,5% et 43,5%). La purification des membranes plasmiques s'obtient par centrifugation pendant 4h à 35000 g. La bande d'intérêt est récupérée à l'interface des deux phases du gradient et diluée dans quatre volumes d'eau. Enfin, une dernière centrifugation 20 min à 80000g et une re-suspension du culot dans le tampon B ont été réalisées.

Ce premier test d'extraction s'est effectué sur quatre biomasses de chaque souche avec les paramètres décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Modalités testés pour l'extraction des membranes plasmiques

Souches	Frais /congelé	Date de récolte	Poids frais (g)
Rs552	Frais	18/01/2022	1,98
			2,17
			2,12
	Congelé	03/08/2021	5,80
S755	Frais	18/01/2022	7,57
			7,01
			5,37
	Congelé	03/08/2021	8,17

Résultats

Pré-traitement pour l'obtention des membranes plasmiques

Pour la déstructuration des pellets, huit méthodes ont été testées et comparées à un témoin sans traitement (Figure 1A). Les méthodes avec les billes seules déstructurent le mycélium et les hyphes (Figure 1C). Les méthodes ultraturrax et ultraturrax + ultrasons laissent des amas de mycélium avec des hyphes encore bien formés (Figure 1DE). Mais l'ensemble reste en paquet. Les quatre dernières méthodes quant à elles détruisent les hyphes (Figure 1FGHI). Les méthodes avec les billes combinées aux autres techniques (Figure 1HI) permettent de ne pas avoir beaucoup d'amas mais cela complexifie le pré-traitement pour la récupération des billes. La technique compilant ultraturrax à la presse de french (Figure 1F) est la meilleure technique permettant la déstructuration du pellet et de la lyse des cellules.

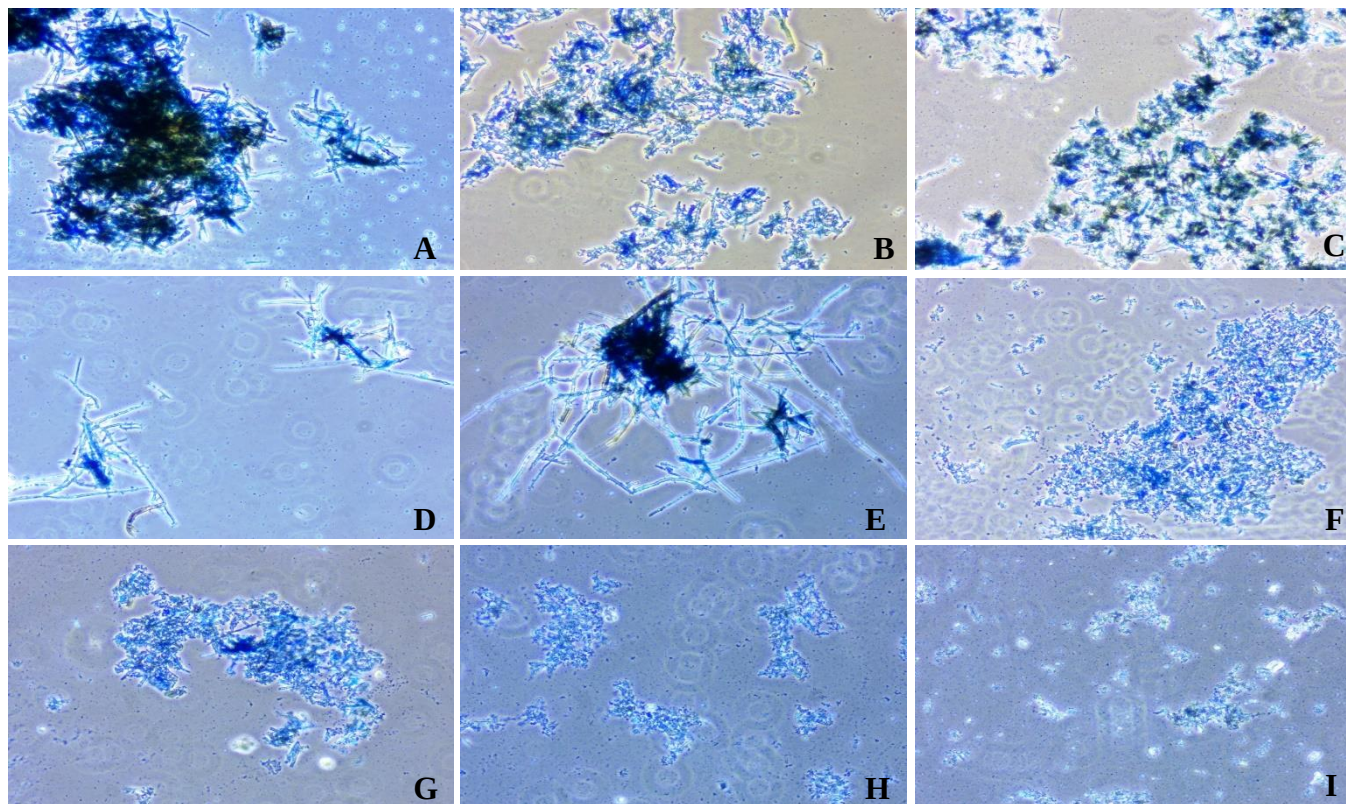


Figure 1 : Observation microscopique des pellets de *V. inaequalis* après pré-traitement à grossissement x100. Toutes les photos ont été prises après le pré-traitement. A: contrôle ; B: billes A ; C: billes C ; D: ultraturrax ; E: ultraturrax + ultrasons ; F: ultraturrax + press de french ; G: ultraturrax + ultrasons + press de french ; H: ultraturrax + press de french + bille A ; I : ultraturrax + press de french + bille C.

Extraction membranes plasmiques

Une fois le meilleur pré-traitement défini, une première extraction a été réalisée. Un test d'extraction sur de la biomasse congelée et fraîche a été effectué pour voir s'il y avait une différence lors des étapes d'extraction. Aucune différence notable n'a été constatée entre les modalités fraîches et congelées. Il ne semble pas y avoir eu de problèmes durant les différentes étapes. Cependant, lors de la centrifugation pour obtenir la bande d'intérêt contenant les membranes plasmiques, un problème a été observé. Il n'y a pas eu de bande d'intérêt entre les deux phases (Figure 2). La suite du protocole n'a donc pas été poursuivie. De plus, par manque de temps durant le doctorat, la partie extraction des membranes pour analyser ensuite les lipides membranaires a été abandonnée.

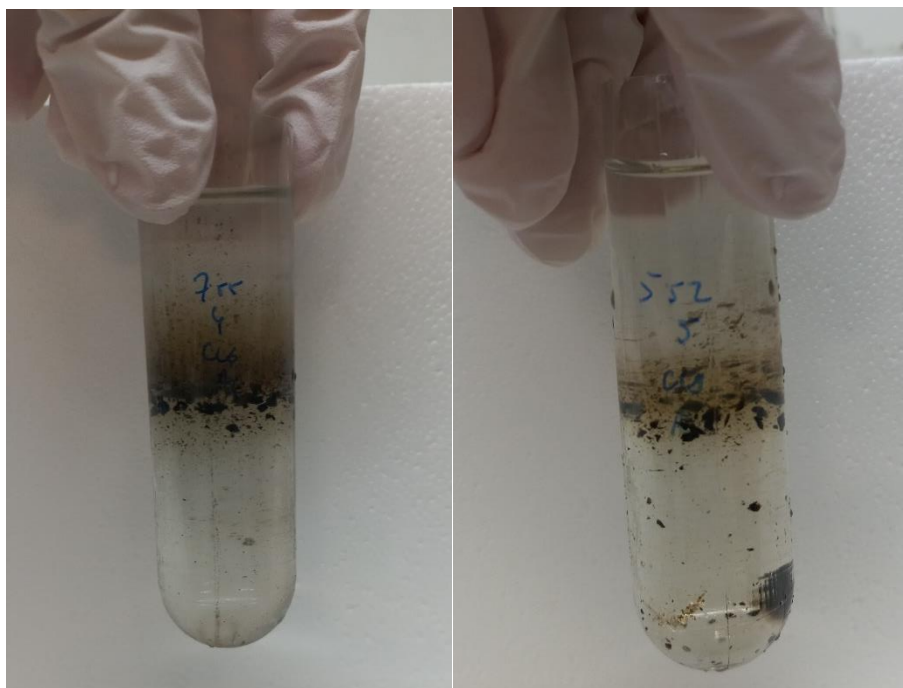


Figure 2 : Séparation des membranes plasmiques de *V. inaequalis* sur gradient de saccharose.

