

AGROFLASH

AGRONOMIE hepia JUIN 2018

ÉDITO

La lutte microbiologique sera au nombre des alternatives aux pesticides de synthèse, en raison de son innocuité pour l'environnement.

Elle est déjà appliquée avec succès dans des contextes de production très divers, en grande cultures, en maraîchages, en productions fruitières et en foresterie, et sous des climats variés.

La lutte microbiologique, c'est l'utilisation de micro-organismes et virus contre d'autres micro-organismes, mais aussi contre des nématodes, des insectes, des plantes adventices ou invasives. Moins connue du public, elle apparaît avec le développement de la microbiologie et de la pathologie végétale à la fin du 19^{ème} siècle. L'idée que des microorganismes pathogènes d'insectes, produisant des maladies chez les ravageurs, puissent être utilisés pour les contrôler fut proposée par Le Conte (1872) aux Etats-Unis et Pasteur (1874) en France, rejoints en cela par Metchnikov, Krassil'schik, Paillot et d'Hérelle, que l'on compte au nombre des précurseurs de cette forme de lutte. Il faudra cependant attendre le milieu du 20^{ème} siècle et les développements technologiques de moyens de production de ces microorganismes pour en voir les premiers succès avec les premières productions commerciales de bacille de Thuringe, une bactérie pathogène d'une grande variété d'insectes. Ces cinquante dernières années, dans un effort de domestication des microorganismes, des milliers de souches de quelques centaines d'espèces de bactéries, champignons et virus, ont été évaluées et quelques dizaines sont d'ores et déjà commercialisées.

Dans le cadre du cours de lutte microbiologique, les étudiants ont pu réaliser ces articles de vulgarisation de travaux récents

que nous vous proposons dans cette édition spéciale Lutte microbiologique d'Agroflash. Au menu: la lutte microbiologique contre *Ralstonia solanacearum*, un nouveau fléau de l'agriculture vivrière, les moyens de lutte microbiologique contre le feu bactérien des rosacées, les utilisations de champignons entomopathogènes contre les tétranyques, les taupins et les punaises et les bactéries inductrices de résistances chez les plantes. Certains enthousiastes se sont lancés dans un reportage vidéo sur l'utilisation de la lutte microbiologique dans notre région qui est présenté ici et que vous pourrez découvrir sur Youtube.

Nous espérons que ces articles seront pour le lecteur l'occasion de découvrir les nouvelles voies ouvertes pour lutter contre les maladies et les ravageurs des plantes cultivées.

François Lefort
Professeur, filière agronomie

SOMMAIRE

Beauveria bassiana, vers une lutte microbiologique intégrée ?

Rémy Millet, Guillaume Joray,
Robin Sonnard, Antoine Hegetschweiler 2 - 5

Metarhizium anisopliae, application en lutte microbiologique

Noé Bisenz, Quentin à Haouariki Coirentin
Descombes, Samuel Engel 6 - 13

Ralstonia solanacearum le nouveau fléau de l'agriculture vivrière,

David Bollier, Laetitia Scheidegger, Emilie Favre,
Alessia Mercado 14 - 18

Le taupin, un ravageur qui a la patate,

Dylan Maret, Romain Salamin, Falc Zolling 19 - 22

B. amyloliquefaciens : aux racines de nos cultures,

Cédric Wetta, Aurélien Guien,
Antoine Chandelier 23 - 27

Erwinia amylovora, la bactérie qui met le feu aux cultures !

Ryan Ibrahim, Laurent Marchon, Hajar Outdili
Hajar, Matthias Schmid 28 - 33

IMPRESSUM

h e p i a

Haute école du paysage, d'ingénierie
et d'architecture de Genève

CONTACT AGROFLASH:
Nadia Youfi Picenni, nadia.picenni@hesge.ch

CONTACT AGRONOMIE LULLIER:
Site Lullier Site Genève
Route de Presinge 150 Rue de la Prairie 4
CH - 1254 Jussy CH - 1202 Genève
t +41 22 546 68 12 t +41 22 546 24 04
f +41 22 546 24 10 f +41 22 546 24 10
sv.hepia@hesge.ch sv.hepia@hesge.ch

 /FiliereAgronomieHepia

Beauveria bassiana, vers une lutte microbiologique intégrée ?

Beauveria bassiana est un champignon entomophage très utilisé dans la lutte microbiologique. Ses cibles sont aussi nombreuses que variées, ce pourquoi il suscite un grand intérêt pour l'agronomie. Cet article propose d'en savoir plus sur ce champignon, son fonctionnement, son efficacité et les limites de sa compatibilité avec d'autres moyens de lutte biologique

Beauveria bassiana est un champignon appartenant à la

il n'infecterait ni les humains ni les autres animaux à sang chaud. De toute évidence,



Figure 1: Punaise atteinte de « muscardine blanche ». Source: <http://organicsoiltechnology.com/us-beauveria-bassiana-entomopathogenic-fungi.html>

division des Ascomycètes et à la famille des Cordycipitacées. Il est présent dans le sol sur toute la surface du globe. Anciennement appelé *Tritirachium shioteae*, c'est en 1835 qu'il a été décrit par Agostino Bassi, qui a découvert qu'il était responsable de la muscardine du ver à soie, aussi appelée « mal de segno ». En effet, ce champignon est entomophage et, en 1906, l'Association française pour l'avancement des sciences (Afas) fait part de sa volonté de poursuivre les recherches sur *B. bassiana* afin d'élaborer des solutions phytosanitaires. Il s'agit en fait de la forme asexuée du champignon *Cordyceps bassiana* (la forme sexuée ayant été mise en évidence en 2001 seulement).

Beauveria agit comme parasite d'une grande diversité d'insectes, auxquels il inflige des maladies, principalement « la muscardine blanche » (Fig. 1). Les insectes véhiculent les spores de ce champignon, lors de leurs déplacements et contaminent ainsi les autres. Ceci confère donc au champignon la capacité d'être un agent de lutte efficace contre beaucoup d'insectes nuisibles aux cultures, surtout en culture biologique, où les produits de synthèse ne peuvent être utilisés. De plus,

il existerait d'ores et déjà des résistances chez certains insectes, majoritairement ceux vivants dans ou à proximité du sol, par sélection naturelle, mais beaucoup d'insectes aériens y sont sensibles. Son utilisation se pratique contre plusieurs ravageurs tels que les mouches

blanches, les termites, la mouche de la cerise (*Rhagoletis cerasi*), le papillon tueur de palmier (*Paysandisia archon*), certains charançons, les pucerons et les thrips. Les traitements contre les moustiques vecteurs de la malaria et les taupins sont en phase d'expérimentation. *Beauveria bassiana* peut lui-même parasiter un autre champignon mycoparasite de la même classe, *Syspastospora parasitica*. Bien évidemment, les cultures traitées avec *B. bassiana* sont celles attaquées par les ravageurs énumérés ci-dessus, comme les cultures de tomates, de cerises, de poivrons, de palmiers et plantes ornementales, pour les principales. La majorité des cultures traitées étant cultivées sous serre.

Un agent de lutte à portée de main

Beauveria bassiana se trouve naturellement dans de nombreux écosystèmes.

Ces écosystèmes aménagés correctement peuvent favoriser l'agent de lutte. Ainsi, le cycle naturel de *B. bassiana* infecte les insectes qui participent à sa dissémination

Sol

Beauveria bassiana est un champignon résidant naturellement dans des sols souvent couverts et non cultivés et donc également fréquemment présent sous les haies vives. Ce champignon se prête mieux à l'agriculture biologique de conservation que d'autres champignons entomophages comme *M. anisopliae* du fait qu'il se trouve naturellement dans le sol.

Insectes

Beauveria bassiana infecte naturellement une large variété d'insectes qu'ils soient ravageurs de cultures ou non. De ce fait, dans les régions tempérées d'Europe, le champignon entomophage a été identifié dans plus de 700 espèces d'insectes ravageurs. La présence du champignon dans une large variété d'insectes lui assure une bonne dissémination car leur comportement et leur mobilité sont également très variés.

Associations de plantes

La présence endophyte de *Beauveria bassiana* dans certaines plantes comme le maïs est souvent démontrée comme une stratégie symbiotique qui permet au champignon de se développer et de sporuler à l'intérieur des insectes phytophages du maïs.

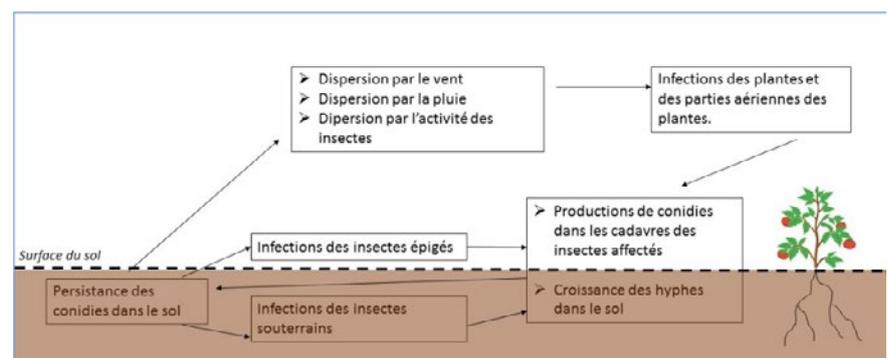


Figure 2 présence des différentes formes de *B. bassiana* dans un milieu naturel

Morphologie

***Beauveria bassiana* se manifeste par la production de colonies blanches à jaunâtres à l'aspect « cotonneux ».**

Les organes de reproduction (spores ou conidies) sont soutenus par des filaments en zigzag relativement longs qui sont en réalité des hyphes transparents

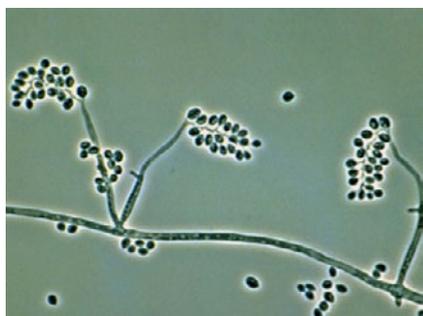


Figure 3 hyphes de *bassiana*

Les conidies sont produites au sommet de courts épis ce qui donne aux cellules conidiogènes un aspect épineux. *B. bassiana* produit deux formes de spores tout aussi infectieuses l'une que l'autre suivant les conditions du milieu. En milieu aérobie, le champignon produit des conidiospores de forme sphérique de 1 à 4 µm de diamètre et en milieu anaérobie, il produit des blastospores de forme ovale de 2 à 3 µm de longueur.

Mode d'infection

L'infection par *Beauveria bassiana* (fig. 4) peut être scindée en 4 phases distinctes : l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration.

L'adhésion est caractérisée par un

mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec les cellules du tégument de l'insecte. On peut distinguer deux étapes, la première passive où on observe l'attachement des spores par des forces hydrophobes et électrostatiques à la cuticule de l'insecte. La deuxième, active, est caractérisée par une production de mucilage qui va modifier la partie la plus externe de la cuticule de l'insecte et permettre la germination. L'épicuticule est composée d'une couche cireuse qui contient des acides gras qui ne facilitent pas l'adhésion des spores du champignon. Une fois la phase d'adhésion terminée, la germination peut se faire suivant les conditions environnantes et les conditions physiologiques de l'hôte dont notamment la composition biochimique de sa cuticule. Ces facteurs vont favoriser ou au contraire inhiber la germination.

La différenciation est l'avant dernière phase de l'infection et elle se caractérise par la production d'un appressorium, structure terminale qui va servir de point d'encrage, ramollir la cuticule et favoriser la pénétration. La production de ces appressoria est très liée à la valeur nutritive de la cuticule de la cible. De ce fait, une cuticule très riche en nutriment va favoriser la croissance mycélienne plutôt que le développement d'appressorium.

La pénétration se fait suite aux pressions mécaniques et enzymatiques produites par les lipases, les chitinases et les protéases qui ont un rôle prépondérant dans la pénétration de l'hôte. Des toxines non enzymatiques produites par certaines

souches de *Beauveria* peuvent également accentuer et accélérer le processus d'infection.

Le champignon ne peut donc coloniser l'hôte que lorsque celui-ci parvient à déjouer les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte et envahir l'hémolymphe. Lorsque l'insecte meurt, le champignon produit de l'oosporine, un antibiotique qui va lui permettre de persister malgré la compétition des bactéries saprophytes présentes dans le tube intestinal de l'insecte. La phase saprophyte est caractérisée par la momification du cadavre qui sera métamorphosé en sclérote. Le tégument est traversé par les hyphes au niveau intersegmentaire puis recouvert d'un feutre mycélien cotonneux et blanc qui va enclencher la production de conidiospores. Le cycle entier de l'infection à mort de l'insecte dure entre 3 et 10 jours.

Réponses immunitaires de l'insecte

Les insectes ne sont pas sans défense face à ces champignons entomophages. Ils sont pourvus de défenses naturelles non spécifiques qui leur servent de rempart aux infections.

La défense des insectes est composée de barrières structurelles passives comme la cuticule. Le tégument chitineux de l'insecte constitue une barrière primaire efficace contre l'infestation de champignons, bactéries ou virus.

Les insectes réagissent également après que l'agent pathogène ai percé la cuticule. Ces réponses actives peuvent être cellulaires comme la phagocytose, l'encapsulation ou la sécrétion de peptides anti fongiques, qui vont tuer directement les pathogènes.

Commercialisation

Dans le commerce, différentes souches de *Beauveria bassiana* sont disponibles sous diverses formulations.

En Suisse, Naturalis-L® (Andermatt Biocontrol) est proposé sous forme de solution liquide. Il est destiné à lutter contre la mouche de la cerise et les mouches blanches (*Trialeurodes vaporariorum* et *Bemisia tabaci*) dans les cultures de cerises, tomates, poivrons et plantes ornementales. A noter que ce produit est miscible avec d'autres insecticides, mais il n'est pas conseillé de le mélanger avec des fongicides. Il est

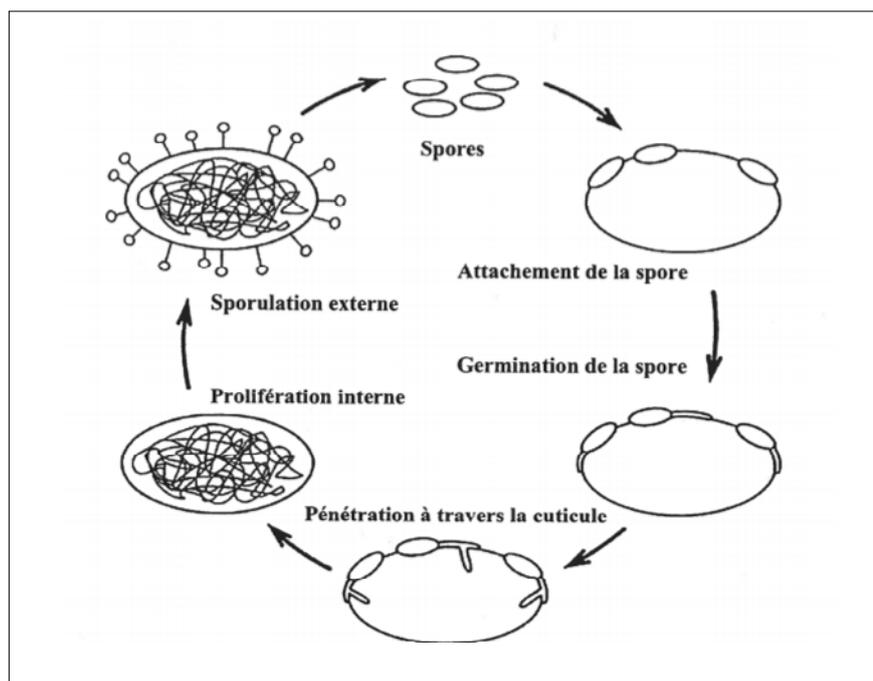


Figure 4 Infection d'une spore sur la cuticule d'un insecte (R. Sabbhi, 2008)

homologué en culture biologique.

En France, Ostrinil®(Arysta) se présente sous forme de microgranulés d'argile et est homologué en culture bio pour les cultures de palmiers non alimentaires contre Paysandisia archon.

En Amérique du Nord, BioCeres® WP est disponible sous forme de poudre mouillable et est homologué en culture bio dans la lutte contre les aleurodes, les pucerons, les thrips et l'agrile du frêne. Il s'utilise dans les cultures en serre de tomates, concombres, fines herbes, épices, cannabis médical, boutures de patates douces et les cultures ornementales. Il est compatible avec d'autres insecticides,

Un exemple d'efficacité contre la punaise terne (*Lygus lineolaris*)

L'objectif de cette étude était de mesurer l'impact de l'emploi de *Beauveria bassiana* sur les populations de la punaise terne (*Lygus lineolaris*) dans les vignobles.

La première étape visait à déterminer la pathogénicité et la virulence (CL₅₀ et TL₅₀) des isolats INRS-CFL et INRS-1P de *B. bassiana* sur les populations adultes et nymphales de la punaise terne. La seconde étape avait pour but de comparer l'effet de l'application des deux isolats de *B. bassiana* et de l'insecticide chimique cyha-

Les résultats ont démontré qu'il y a une différence significative entre la mortalité des adultes et celle des nymphes de *L. lineolaris* exposées aux différentes concentrations des isolats INRS-CFL et INRS-1P de *B. bassiana* (Tukey HSD; $p < 0.0001$), (figure 5).

En conditions contrôlées de laboratoire, ces isolats montrent un potentiel insecticide intéressant contre les adultes et les nymphes de la punaise terne.

Expérience en culture de vigne

Une seconde expérience avait pour but de comparer l'effet de l'application de ces deux mêmes isolats et de l'insecticide chimique cyhalothrin (Matador®) sur les populations des adultes de la punaise terne dans les vignobles.

Les mortalités observées chez les adultes de la punaise terne dans les parcelles du témoin étaient inférieures à 16 %. En revanche, la mortalité atteint 99,16 % chez les insectes exposés au cyhalothrin (figure 6).

Compatibilité avec d'autres méthodes de lutte de biologique

Afin de palier à un éventuel manque d'efficacité, il est recommandé d'utiliser des stratégies intégrées de lutte, reposant sur plusieurs agents de contrôle du ravageur (Calvo et al, 2009).

Ces stratégies consistent à introduire simultanément plusieurs agents de lutte dans le même système de culture afin de réduire la présence du ravageur. L'objectif est de profiter au maximum de l'action simultanée de plusieurs agents de lutte, tandis que l'interaction entre ces mêmes hôtes est limitée. Cette « guildes » peut être positive si l'interaction favorise le contrôle du ravageur ou négative si au contraire un agent de lutte diminue la prédation d'un autre sur le ravageur. Il est ainsi nécessaire de tester la compatibilité des prédateurs en se reposant sur plusieurs éléments : temps de recherche de nourriture, reproduction, période d'application du pathogène, conditions environnementales ou encore la densité du ravageur.

La compatibilité de *Beauveria bassiana* avec deux insectes prédateurs de Trialeurodes vaporariorum a été étudiée: mbylseius swirskii (acararien de la famille des Phytoseiidae) et Encarsia

Isolat	Stade d'insectes	CL ₅₀ conidies/ml	Intervalle de confiance		TL ₅₀ Jours	Intervalle de confiance	
			inférieur	supérieur		inférieur	supérieur
INRS-CFL	Nymphe	8 x 10 ⁵	3.73 x 10 ³	5 x 10 ⁵	4.77	4.43	5.06
	Adulte	1.7 x 10 ⁵	8 x 10 ²	1.8 x 10 ⁶	5.02	3.33	6.66
INRS-IP	Nymphe	1.7 x 10 ⁴	2 x 10 ¹	3.4 x 10 ⁵	5.03	3.13	4.77
	Adulte	5.9 x 10 ⁶	0.3 x 10 ³	2.6 x 10 ⁷	6.29	3.07	7.59

Tableau 1: Pathogénicité et virulence des isolats de *Beauveria bassiana* vis-à-vis des adultes et nymphes de *Lygus lineolaris* à une concentration de 1.106 conidies/ml

certaines fongicides et avec la plupart des insectes auxiliaires bénéfiques.

Il est important de relever que ce n'est pas parce qu'un produit phytosanitaire est constitué d'un agent de lutte naturel et qu'il est homologué en culture bio qu'il est inoffensif. Toutes les notices des produits cités précédemment précisent qu'il faut prendre garde de ne pas déverser de résidus dans les eaux et qu'il faut se protéger convenablement lors de l'application, comme avec tout autre produit phytosanitaire. Ceci est dû au fait que ces produits ne contiennent pas uniquement des souches de *Beauveria bassiana*, mais également des adjuvants, qui, eux, sont potentiellement toxiques. L'entreprise BioWorks, Inc., aux Etats-Unis, commercialise BotaniGard® ES et 22WP (sous forme de suspension émulsifiable et de poudre mouillable) et Mycotrol® ESO et WPO homologués en culture bio. Ils sont miscibles avec d'autres insecticides, acaricides, engrais et même plusieurs fongicides. Ils ont l'avantage de ne nécessiter aucune réfrigération et la durée de conservation est relativement grande, malgré qu'il faille tout de même faire attention du fait qu'ils contiennent un champignon vivant.

lothrin (Matador®) sur les populations des adultes de la punaise terne dans les vignobles.

Expérience en laboratoire

Les résultats ont démontré qu'il y a une différence significative entre la mortalité des adultes et celle des nymphes de *L. lineolaris* exposées aux différentes concentrations des isolats INRS-CFL et INRS-IP de *B. bassiana*.

L'isolat INRS-CFL est plus virulent que l'isolat INRS-IP contre les nymphes et contre les adultes de *L. lineolaris*. En effet, les temps létaux (TL₅₀) sont tous les deux inférieurs chez les isolats INRS-CFL (4.77 chez les nymphes, 5.02 chez les adultes) alors que les temps létaux avec les isolats INRS-IP sont respectivement de 5.03 et 6.29 chez les nymphes et les adultes (tableau 1).

Les concentrations létales des isolats INRS-IP et INRS-CFL entraînant 50 % de mortalité (CL₅₀) chez les nymphes de la punaise terne ont été estimées à, respectivement, de 8 x10⁵ et de 1.77 x10⁴ conidies/ml et chez les adultes à 1.7 x10⁵ et de 5.9 x10⁶ conidies/ml 6 jours après l'inoculation (tableau 1).

formosa (hyménoptère de la famille des Aphelinidae) sont deux prédateurs connus

L'étude sur la compatibilité avec Encarsia formosa soulève d'autres éléments d'importance

dans la relation intraguildes des agents de lutte de Trialeurodes vaporariorum. L'insecte n'a

pas montré de spécificité de choix dans les proies (infectées ou non), ce qui a permis une diffusion plus rapide du champignon entomophage à d'autres ravageurs non infectés. De plus, le traitement avec Naturalis-L (un produit commercial largement diffusé pour les traitements avec *B. bassiana*) a eu un effet repoussant sur *E. formosa*, en raison peut-être de certains composants contenus dans le produit.

La compatibilité des méthodes de lutte avec *Beauveria bassiana* doit être encore beaucoup plus étudiée, principalement en conditions au champ, afin de déterminer les seuils d'efficacité possible de ces interactions. Il est également important de tester différentes périodes d'applications et différentes souches du champignon pour une intégration optimale des stratégies de luttés biologiques.

Rémy Millet, Guillaume Joray, Robin Sonnard, Antoine Hegetschweiler.

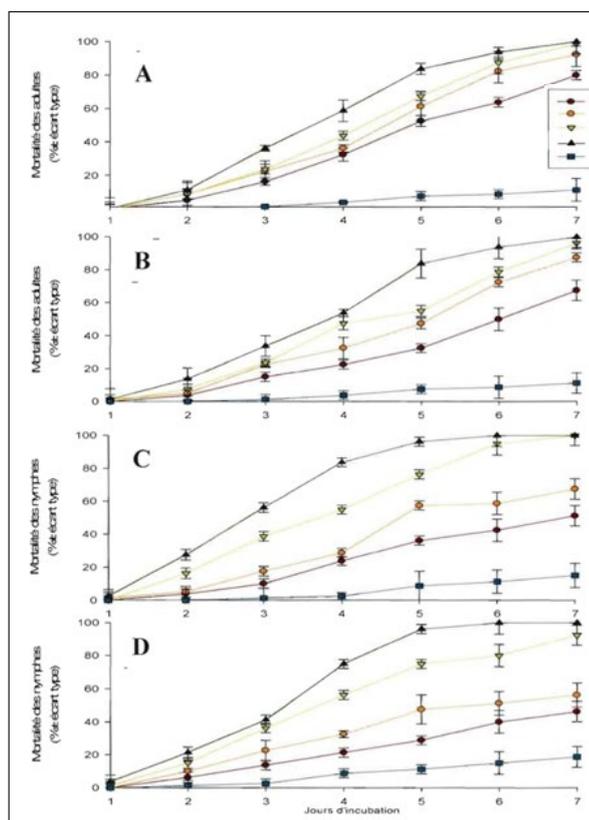


Figure 5 Mortalité des adultes et nymphes de la punaise terne exposées aux différentes concentrations des deux isolats de *Beauveria bassiana*. A - Adulte (INRS-CFL); B - Adulte (INRS-IP); C - Nymphe (INRS-CFL); D - Nymphe (INRS-IP)

des aleurodes. Les résultats présentés ici sont le résultat d'expérimentation en laboratoire.

Dans les figures 7, 8 et 9, il est observé une augmentation du temps de recherche d'une proie, une diminution du temps d'alimentation et une diminution du temps de prédation de *A. swirskii* lors de l'application de *Beauveria bassiana*. Le temps de recherche est un comportement important pour l'insecte lui permettant de se nourrir, de se reproduire, de trouver un lieu d'oviposition et des refuges. Des éléments externes, tels qu'un agent pathogène, peuvent modifier ce temps de recherche. Ces résultats montrent que l'insecte détecte la présence de l'entomopathogène et limite son interaction avec. Toutefois, cette augmentation du temps de recherche, ainsi que la limitation de son alimentation sur les individus contaminés par le champignon diminuent le taux de prédation de l'insecte. Ces résultats s'expliquent aussi par une augmentation du temps de toilettage de l'insecte, activité essentielle pour limiter la contamination des agents pathogènes sur des organes sensibles, et donc de la baisse du taux de prédation.

Bioprotection, A. (s. d.). BioCeres® WP bio-insecticide à base de *Beauveria bassiana*. Consulté 28 décembre 2017, à l'adresse <http://anatisbioprotection.com/produits-lutte-biologique/insecticide-biologique-bioceres.html>

Calvo, F. J., Bolckmans, K., & Belda, J. E. (2009). Development of a biological control-based Integrated Pest Management method for *Bemisia tabaci* for protected sweet pepper crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 133(1), 9-18. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00896.x>

Ferron, P. (1978). Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>

Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>

Naturalis-L. (s. d.). Consulté 28 décembre 2017, à l'adresse https://www.biocontrol.ch/fr_bc/naturalis-l

New organic-approved formulations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. (s. d.). Consulté 28 décembre 2017, à l'adresse <http://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=22007>

Oreste, M., Bubici, G., Polisenio, M., & Tarasco, E. (2016). Effects of entomopathogenic fungi on *Encarsia formosa* Gahan. (Hymenoptera: Aphelinidae) activity and behavior. *Biological Control*, 100, 46-53.

Ostrinil - *Beauveria bassiana* - Techipalm. (s. d.). Consulté 28 décembre 2017, à l'adresse <http://www.techipalm.com/traitement-bio-palmiers/ostrinil>

Seiedy, M. (2015). Compatibility of *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) and *Beauveria bassiana* for biological control of *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Systematic and Applied Acarology*.

Taxonomy Browser. (s. d.). Consulté 30 décembre 2017, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

Bibliographie

- Beauveria bassiana*. (2017, décembre 13). In Wikipédia. Consulté à l'adresse https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Beauveria_bassiana&oldid=143486594
- Beauveria bassiana* Entomopathogenic Fungi | OrganicSoilTechnology. (s. d.). Consulté 30 décembre 2017, à l'adresse <http://organicsoiltechnology.com/fungus-beauveria-bassiana-entomopathogenic-fungi.html>
- biopesticidal-formulation-of-beauveria-bassiana-effective-against-larvae-of-helicoverpa-armigera-2155-6202.1000120.pdf. (s. d.). Consulté à l'adresse <https://www.omicsonline.org/biopesticidal-formulation-of-beauveria-bassiana-effective-against-larvae-of-helicoverpa-armigera-2155-6202.1000120.pdf>

Metarhizium anisopliae, un champignon entomopathogène utile pour la lutte microbiologique, contre *Tetranychus sp.*

Noé Bisenz, Quentin à Huariki, Corentin Descombes et Samuel Engel

Cours : Lutte microbiologique
Prof. François Lefort

Introduction

Suite à de nombreuses études qui ont démontrés les risques sanitaires et environnementaux que représentait l'utilisation des pesticides chimiques, le développement de la lutte microbiologique a su trouver de nouvelles alternatives beaucoup plus saines et durables pour les agrosystèmes. Il est aussi de fait, que de plus en plus de ravageurs développent des résistances à de nombreux pesticides et les essais en lutte biologique avec des lâchés d'auxiliaires se montrent parfois peu satisfaisants. C'est dans un contexte comme celui-ci que les caractéristiques des champignons entomopathogènes, tel que *Metarhizium anisopliae* notamment, suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêts dans la recherche agronomique. Les recherches qui ont testé son utilisation à des fins phytosanitaires se sont avérées très concluantes. En effet les résultats de nombreuses études relèvent une forte activité toxinogène de *M. anisopliae* vis-à-vis de plusieurs importants ravageurs des cultures, en produisant des muscardines à différents stades de leur développement. Ces diverses études vont être évoquées et développées plus en détails dans la suite du document.

Les champignons entomopathogènes

Les champignons se présentent généralement sous forme de fins filaments appelés hyphes. Ces hyphes assemblées constituent le mycélium. On en connaît actuellement environ 1000, appartenant principalement aux ordres des Hypocreales et des Entomophthorales (Becher et al., 2017; Lacey, 2017), qui causent des maladies chez les arthropodes. Les propriétés avantageuses recherchées sont une gamme d'hôtes restreinte, un bon potentiel à se répandre et une bonne persistance des spores (Hajek et Delalibera, 2010). Ce qui a pour conséquence que les espèces commercialisées pour la lutte microbiologique sont principalement des Hypocreales. Ainsi, *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith et *Lecanicillium* spp. sont utilisés contre de nombreux ravageurs dans une multitude de cultures (Lacey, 2017). Ces micro-organismes sécrètent des composés organiques toxiques pour certains insectes, dont des ravageurs et sont capables de les parasiter. Les espèces déjà commercialisées appartiennent aux genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* ou *Verticillium*. Ils sont connus depuis plus de 170 ans mais ne suscitent l'intérêt des agronomes que depuis le début du XXI^{ème} siècle. Ce genre de champignon régulent naturellement les populations d'insectes trop envahissantes ou néfastes pour les écosystèmes. Il paraît alors tout à fait logique de s'en inspirer et de l'appliquer dans nos agrosystèmes.

Metarhizium anisopliae

• Classification et description

Les espèces du genre *Metarhizium* produisent des spores sexuées uniquement dans des cas exceptionnels. Ces champignons se développent généralement sous leur forme mycélienne et se reproduisent par formation de « conidies »¹ (Figure 1, A).

Du point de vue phylogénétique, si le genre *Metarhizium* (Figure 1, B), appartient à la famille des *Clavicipitaceae*. (*Ascomycota*), sa taxonomie a été passablement revue ces dernières années. En effet,

agriculture *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metschnikoff) Sorokin est en fait un complexe de 9 espèces cryptiques génétiquement distinctes, mais morphologiquement identiques (Bischoff et al., 2009; Chandler, 2017) : *M. anisopliae* s.s., *M. guizhouense* (syn. *M. taii*), *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidio-tae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. robertsii*, et *M. brunneum*, s'ajoutant aux espèces connues *M. album*, *M. flavoviride* et *M. rigidum*.

• Métabolites secondaires, production de toxines

Les mycotoxines sont des composés naturels toxiques, élaborés par de nombreuses espèces de champignons. Ce

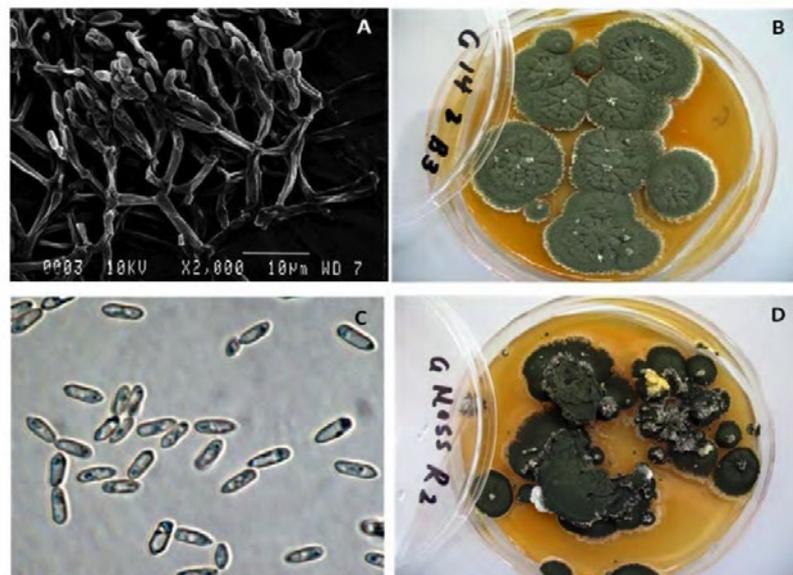


Figure 1:
A: mycélium de *M. anisopliae* avec sporulation de conidies ;
B: Culture de *M. anisopliae* sur gel de dextrose ;
C: conidies de *M. flavoviride* ;
D : Culture de *M. flavoviride* sur gel de dextrose
Sources : Benserradj et Al. , 2014

l'espèce la plus utilisée en

¹ Les conidies sont la forme de sporulation asexuée chez les champignons.

sont des métabolites secondaires, elles n'ont par conséquent pas de rôle évident dans l'économie de la cellule qui les synthétise. Ces

mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses, correspondant à leur voie de biosynthèse : polycétoacides, acides aminés, ou encore des dérivés terpéniques.

Lors de la pénétration de l'hyphe dans l'insecte, *Metarhizium anisopliae* produit des mycotoxines essentielles, dont le rôle est d'accélérer la mort de l'hôte, mais aussi la prolifération du champignon. Ces dernières sont de plusieurs natures, mais les plus intéressantes font partie du groupe des destruxines. Leur toxicité joue un rôle important dans le déroulement de la pathogénèse du champignon, de plus, elles possèdent un large spectre d'insectes cibles.

Les résultats d'une étude (effectuée sur 10 espèces, de plusieurs ordres : Lépidoptères, Diptères, Coléoptères) révèlent que la destruxine E présente la plus forte activité cytotoxique. Testé sur le lépidoptère *Galleria mellonella*, cet effet cytotoxique provoque une paralysie tétanique immédiate, mais réversible sur le sujet (Benserradj O., 2014). La paralysie serait attribuable à une interaction entre les destruxines et les canaux Ca^{2+} endogènes de l'insecte, ce qui provoque la dépolarisation de ses muscles. Cependant, l'organisme attaqué semble détoxifier rapidement les mycotoxines, d'où la réversibilité des effets. Il est possible que la mortalité rapide

une perturbation de la balance ionique par un mode d'action semblable aux toxines du *Bacillus thuringiensis*.

• **Mode d'infection**

En général, les champignons entomopathogènes tuent les hôtes qu'ils infectent. A titre d'exception, ils peuvent parfois juste réduire leurs activités métaboliques. Ces pathogènes naturels sont par ailleurs plus efficaces lorsque l'insecte est déjà affaibli par un autre facteur : un stress nutritif par exemple. Ils sont également très efficaces lorsque les populations d'insectes cibles sont très denses, comme dans une culture lorsqu'il y a pullulation de ravageurs. Mais c'est avant tout l'état du système immunitaire des insectes qui va fortement influencer la toxicité de ces entomophages.

Contrairement aux autres micro-organismes, ils sont capables d'infecter les insectes directement par pénétration à travers la cuticule². Leurs spores germent et les hyphes pénètrent la cuticule à l'aide d'enzymes digérant la chitine. L'infection sur un hôte se réalise en 4 étapes bien distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination (figure 2).

a) Adhésion :

Avant de pouvoir infecter leur hôte, les spores doivent adhérer aux téguments de l'insecte en s'y attachant fermement. Les spores

n'adhéreront que si elles sont compatibles avec les téguments de l'insecte..

b) Germination :

Une fois les spores fixées sur le tégument, ces dernières vont pouvoir germer et former un appressorium (Figure 3). Cette étape dépendra des facteurs biotiques tels l'état physiologique de l'insecte ainsi que des facteurs abiotiques comme l'hygrométrie ou la température.

c) Pénétration :

La pénétration s'effectue par perforation de l'épicuticule, par les voies stomatiques ou tout autres orifices naturels, grâce à diverses enzymes (protéases, lipases, chitinases). Les composés issus de la dégradation de la chitine permettent la croissance du tube germinatif du champignon, qui croît à travers la procuticule, puis tout le corps de l'insecte (Hajek et St. Leger 1994).

d) Dissémination :

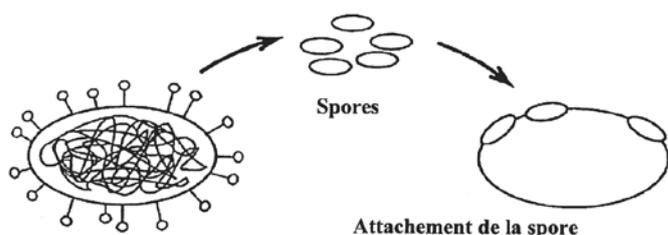
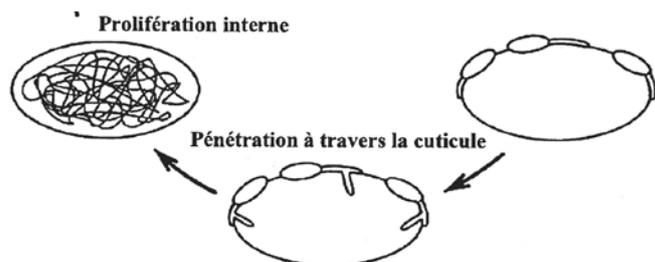


Figure 2: Cycle biologique et mode d'infection des champignons entomopathogènes sur son hôte (Sources : Ferron et al. 1993)



de l'insecte soit provoquée par une attaque des toxines au niveau de l'intestin, en créant

l'incision. Elle est constituée de l'épicuticule qui est formée d'une couche cireuse (acides gras, lipides et stérols) et de l'hypocuticule formée de protéines et de chitine.

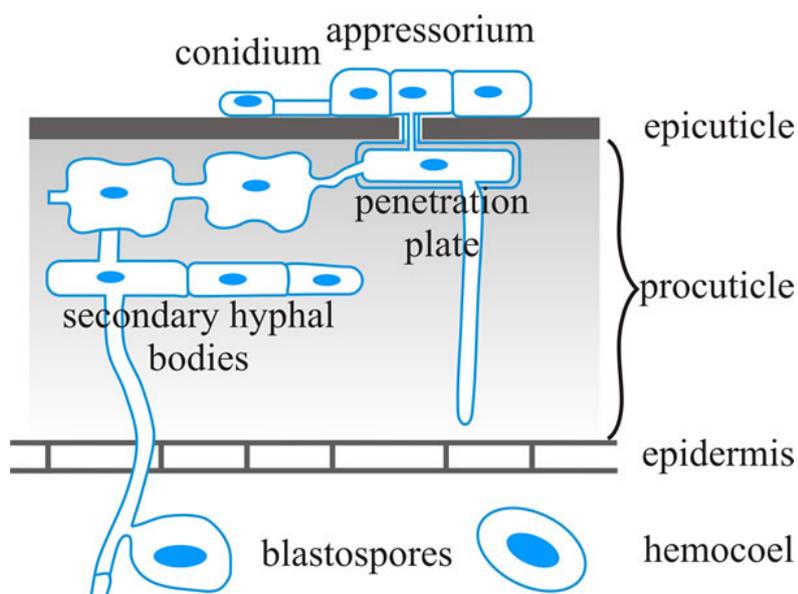


Figure 3: Pénétration et infection de *M. anisopliae*.

Après avoir percé la cuticule et l'épiderme de son hôte, le champignon entre dans le système circulatoire de l'insecte. Il parvient ainsi à se développer dans tous les organes et forme des blastospores. Sous cette forme il assimile les nutriments disponibles et consomme sa proie de l'intérieur. L'insecte meurt ensuite en quelques heures à quelques jours et le corps entier se retrouve envahi d'hyphes, puis le champignon sortira du cadavre de l'insecte pour produire des conidies, qui seront disséminées (Benserradj O., 2014)

Facteurs de toxicité des champignons entomopathogènes

Facteurs externes

La résistance et la sensibilité aux facteurs externes dépendent des phénotypes (écotypes) de *Metarhizium anisopliae*. Les facteurs externes ayant le plus grand impacte sont la température, les conditions hygrométriques, les conditions qu'offre le substrat et l'exposition aux UV.

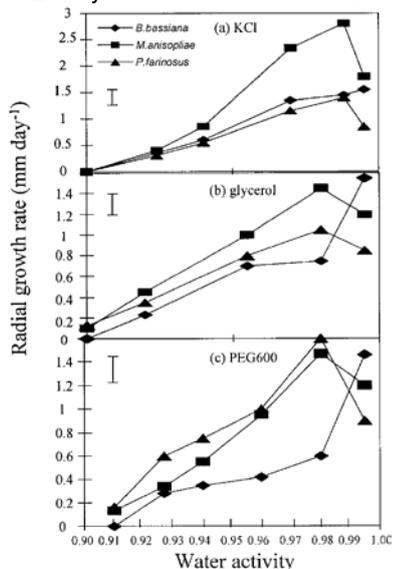
L'humidité relative, est un facteur abiotique très important pour la germination des spores, le développement du champignon, et la pathogénèse. Il existe plusieurs humidités relatives, celle du sol, de l'aire ou de la surface de l'insecte. L'humidité relative à la surface de l'insecte est le paramètre jouant le plus grand rôle pour les champignons entomophages, car il correspond à la disponibilité de l'eau au moment de la germination des spores. Une manière de connaître cette humidité relative est d'utiliser le facteur d'activité de l'eau que l'on nomme (A_w). On le mesure à l'aide d'un facteur entre la pression d'évaporation provoqué par le substrat et la pression de vapeur de l'eau pure à la même température et la même pression (P/P_0), (John E. Hallsworth and Naresh Magan, 1999). On remarque dans l'expérience de John E. Hallsworth et Naresh Magan, qu'un A_w de 95% réduit en moyenne de 50% le taux de croissance des trois genres de champignons entomophages. *M. anisopliae* voit son optimum de taux de croissance, autour d'un A_w de 98-99% pour une température de 25°C (Figure 4). Etant donné que le taux

d'hygrométrie optimal pour le développement du champignon entomophage se calcule à l'aide du A_w , l'hygrométrie est fortement corrélée à la température. Pour cette raison l'optimum de développement de *M. anisopliae* aura un A_w variable en fonction des températures. Ainsi *M. anisopliae* voit sa plage de croissance optimum à un A_w de 98% pour toutes les plages de températures sauf entre 30°C et 37°C ou son optimum se situe cette fois-ci à un A_w de 100% (John E. Hallsworth and Naresh Magan, 1999).

La température a donc un lien avec l'hygrométrie relative (A_w), mais indépendamment de celle-ci, elle peut aussi influencer le développement du champignon en suivant la loi de Liebig, c'est-à-dire que pour 10°C d'augmentation, les réactions métaboliques sont doublées. On remarque dans cette étude (Hallsworth and Magan, 1999) que le taux de croissance de *M. anisopliae* augmente en relation avec l'augmentation de la température, jusqu'à un optimum proche de 33°C (Fig. 6), après lequel le taux de croissance diminue. *M. anisopliae* possède la plage de température la plus élevée et la plus large. En effet, alors que *B. bassiana* et *P. farinosus* voient leur taux de croissance proche de 0 mm/J à 37°C, *M. anisopliae* a une température optimale entre 25°C et 37°C suivant les souches et peut même encore se développer à 40°C. Son taux de croissance n'atteint que 0 mm/J à 45°C (John E. Hallsworth and Naresh Magan, 1999). Cependant, ces variations de sensibilité face aux températures tendraient à mettre en évidence que *M. anisopliae* n'a pas développé de manière généralisée des mécanismes de lutte contre la sécheresse, tels que la solubilisation des lipides ou la synthèse rapide de métabolites secondaires, (Hallsworth and Magan 1999).

• Effet du rayonnement solaire

Le rayonnement solaire est un



des facteurs environnementaux les plus importants dans la persistance des spores de *M. anisopliae*. En particulier, les UVB peuvent endommager les conidies, mais toute exposition à la lumière occasionne des dommages. Certains microclimats peuvent néanmoins favoriser la persistance des conidiospores, comme la protection fournie par

Figure 5. Effet de l'activité hydrique (Aw) x Température sur le taux de croissance de *B. bassiana*, *M. anisopliae* et *P. farinosus*. Sur substrat de glycérol. (Hallsworth and Magan 1999).

l'ombrage des arbres. Cependant, le rayonnement solaire ne comporte pas que des inconvénients dans la persistance des spores, la lumière active également des stimuli lors de certaines phases de développement de *M. anisopliae*.

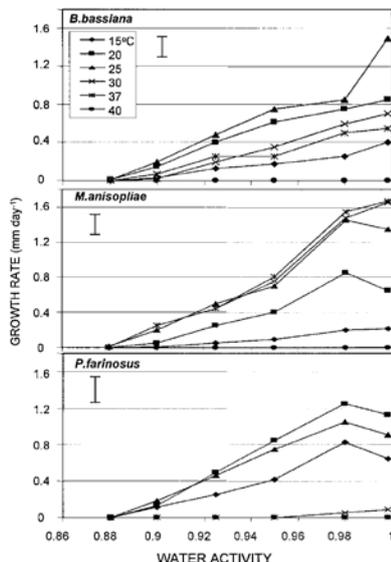
• Facteur édaphique

Le sol constitue le milieu le plus favorable au développement de *M. anisopliae*, car les problèmes liés à la dessiccation, la sensibilité aux rayons ultraviolets et les températures extrêmes sont minimisés. De plus, le sol fournit aussi une source de nutriments, grâce aux insectes morts et aux débris végétaux. De manière générale la présence d'une microflore est bénéfique à *M. anisopliae*.

• Effet de la température sur les taux d'infections de *Metarhizium anisopliae*

Comme vu précédemment

dans le cas de *Metarhizium*, la température est un facteur déterminant du taux de croissance, mais également de la survie et la sporulation des champignons en général. La température peut inhiber la germination des spores et donc la formation du tube germinatif et donc la perforation de la



cuticule de l'insecte. Les conidies de *M. anisopliae* ne peuvent par exemple pas survivre plus de 15 minutes exposées à une température de 40 °C (Benserradj, 2014). De plus le vent peut fortement modifier la nature des microhabitats disponibles à la surface des insectes pour la germination des spores.

L'hôte et le pathogène

Face à l'agressivité du champignon, l'insecte possède aussi des défenses. Son système immunitaire va répondre afin de diminuer l'activité des toxines émises par les hyphes pénétrants dans l'hémolymphe. Les premières réactions actives sont en général la phagocytose par les lymphocytes ou l'encapsulation des toxines. Dans un second temps, des enzymes peuvent être produites telles que la phénoloxidase et les lectines qui inhibe l'activité des protéases. Ces réactions sont influencées par l'état physiologique de l'insecte et la virulence de la souche fongique concernée, d'où l'intérêt de sélectionner rigoureusement une souche à laquelle tous les stades de développement de l'insecte soient sensibles, les larves étant généralement les plus sensibles.

Applications agronomiques de *M. anisopliae*

Souches virulentes de *Metarhizium* utilisés en lutte microbiologique

Le potentiel des souches virulentes de *Metarhizium* est extrêmement large. Plusieurs espèces de ce champignon ont été identifiées à l'heure actuelle pour leur spécificité sur certains insectes. *M. acridium* est uniquement pathogène des orthoptères, mais *M. brunneum* a été isolée à partir de coléoptères, lépidoptères, diptères, hémiptères et thysanoptères. Il existe donc des isolats divers et variés, au spectre d'action large, autant que spécifique. *Metarhizium anisopliae* est plutôt considérée comme une espèce qui infecte une large gamme d'insectes : diptères, thysanoptères, arachnides, blattoptères, etc... Par conséquent, il existe une grande gamme d'isolats plus ou moins efficaces sur chacun de ces ordres, de plus, en fonction des conditions environnementales. Quelques isolats particuliers sont présentés ci-après.

• Production de masse de spores

La commercialisation d'un agent de lutte microbienne dépend bien sûr de son action pathogène, mais également de la facilité et du coût de production. La production de spores de champignons entomopathogènes peut se faire en milieu liquide ou solide. L'étude de Masoud et al. (2014) a permis d'évaluer les meilleurs substrats de culture, et de conclure sur le meilleur rendement en spores viables obtenu sur un substrat liquide composé de mélasse de canne à sucre avec un taux de germination des spores de 99.7%, contre 84.7% pour un milieu pomme de terre. Pour les milieux solides, le riz (95.3% de germination) et les graines de sorgho (93.7% de germination) ont les meilleurs résultats. Certains milieux liquides offrent donc de meilleurs taux de germination. Ils contiennent également plus de chlamydospores (spores végétatives à paroi épaisse de résistance) au contraire des milieux solides qui produisent plus de conidiospores (spores végétative à parois mince).

• Développement des spores de *Metarhizium anisopliae*

Les spores germent au contact avec l'insecte. Lorsque l'humidité relative est suffisante, la phase spermaphyte peut commencer. Elle est caractéristique de la production d'un mycélium d'abord de couleur blanc, qui devient vert lors de la sporulation. La germination des conidies à la surface de l'insecte hôte est la phase la plus délicate pour le champignon car il peut souffrir de dessiccation, d'antibiose de la part de microorganismes mycoparasites, d'inhibition par les lipides cuticulaire, ou encore de dégradation suite à l'exposition aux UV. La réduction du temps de germination est donc une solution adaptée pour augmenter l'efficacité de l'infection (Hassan, Dillon, and Charnley, 1989). Les conidies nécessitent un apport externe de nutriments pour former ces tubes germinaux. On peut accélérer et uniformiser la germination de ces spores en les trempant dans une solution d'eau distillée et d'hydrates de carbone (Hassan, Dillon, and Charnley 1989). Les conidies se fixent sur le corps des insectes mais aussi sur les racines des plantes par la présence de 2 protéines MAD1 (insectes) et MAD2 (plantes) symbiose permettant un effet répulsif des insectes ravageurs, mais aussi curatif de racines dans le sol), qui permet aux conidies de bénéficier d'une petite surface adhésive. Ces protéines réagissent avec l'hémolymphe des insectes ou les exsudats racinaires. La perturbation de MAD1 réduit fortement l'invasion du champignon sur l'insecte ravageur (Wang and Leger 2007). Cela retarde la germination et empêche la formation de blastospores (bourgeonnement). La production optimale de blastospores de *Metarhizium anisopliae* varie en fonction de paramètres spécifiques aux souches qui doivent être évaluées préalablement (Kleespies and Zimmermann 1992). La germination des conidies de *M. anisopliae* aboutit à l'apparition d'hyphes puis d'apressoriums (gonflement de pré-pénétration).

Ravageurs sensibles à *Metarhizium anisopliae*.

Les espèces de *Metarhizium* sont pathogènes d'une large gamme d'arthropodes. En Suisse, les produits commercialisés à base de *Metarhizium anisopliae*, sont généralement confectionnés sur des grains d'orges, contre : les vers blanc du hanneton de la St. Jean (*Metapro*, *Metarhizium Schweizer* et *GranMet GR*), et les otiorrhynques sillonnés ou otiorrhynques de la vigne (*Bio 1020* et *Met52 granular*). Dans le monde, des espèces particulières de *Metarhizium* sont utilisées pour lutter contre de nombreux prédateurs des cultures comme : *Adoryphorus couloni* (Coleoptera : Scarabaeidae) en Australie, le criquet (Acrididae) en Afrique (produit commercial sous le nom de "Green muscle"), *Cleonus punctiventris* (Coleoptera : Scarabaeidae) et *Anisoplia austriaca* (Coleoptera : Curculionidae) en Amérique. Certaines souches sont également exploitées pour lutter contre les moustiques dans les régions à fort taux de paludisme.

Tests réalisés sur *Tetranychus* sp.

• *Tetranychus urticae*

Bugeme et al. (2015) ont démontré l'efficacité d'une souche de *Metarhizium anisopliae* (isolat ICIP78) contre *Tetranychus urticae* sur une culture de haricot artificiellement contaminée.

Tetranychus urticae est un acarien polyphage ravageur de nombreuses cultures sur tous les continents : Solanacées (tomates, pomme de terre, tabac) et d'autres familles. Les productions de haricots, de maïs, de fraises et de chanvre sont aussi impactées. L'expérience a été menée dans les deux conditions de production possible. C'est-à-dire sous serre et en plein champs. L'application du traitement fongique a été réalisé en pulvérisant une solution de 10^8 conidies/ml d'eau.

Les essais comprenaient deux contrôles négatifs (eau, eau+ sylvet-L77=mouillant) et un contrôle positif constitué d'un acaricide chimique (*Abamectine*). Le produit

Sylvet-L77 est un mouillant, ce qui signifie qu'il casse la tension superficielle des gouttes d'eau, augmentant ainsi sa surface spécifique de contact. Or des conditions climatiques telles qu'une hygrométrie élevée et de faibles températures sont connues pour être des obstacles au développement et à l'établissement des colonies d'acaricides. Les résultats sous serres obtenus avec le champignon sont comparables à ceux de l'Abamectine. *M. anisopliae* ICIP78 a donc un fort potentiel comme alternative aux acaricides chimiques conventionnels tels que l'Abamectine contre les infections de *Tetranychus urticae*.

• *Tetranychus truncatus* et *turkestani*

Une étude chinoise, réalisée dans la province de Xinjiang au nord-ouest de la Chine dans le bassin de Tarim, s'est intéressée en 2008 sur les formulations possibles de souches de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* contre *Tetranychus truncatus* et *T. turkestani*, ravageurs courants des cultures de coton irriguées de cette région (Shi, 2008). Caractérisée par un climat typiquement continental, la région constitue l'un des pôles centraux de la production de coton chinois (16% de la production mondiale). La présence des tétranyques pendant la période estivale est une problématique d'importance croissante durant ces dernières années. Les souches Bb734, Bb2860, Ma456 et Ma759 ont été testées sous forme de conidies en huile émulsifiable à raison de 1.5×10^{13} conidies/ha.

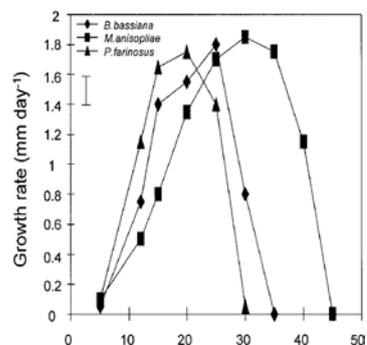


Figure 7 Effet de la température sur le développement de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* et *Paecilomyces farinosus*.

Les densités des tétranyques ont ensuite été comparées en

fonction des facteurs de température et d'humidité relative (Fig. 7). Les formulations ont été pulvérisées sur des blocs randomisés de 6 m sur 8 m, directement sur les feuilles de coton entre 55 et 65 cm de haut. Deux essais ont été effectués sur 35 et 30 jours, le premier par application du traitement à deux reprises avec 15 jours d'intervalle et le second par application d'un unique traitement sur les 30 jours. Un témoin avec traitement au chlorpyrifos⁴ (7.2g AI/ha) dans le second essai a de plus été réalisé. Les populations de *Tetranychus sp.* ont dans tous les cas été significativement contrôlées. Les moyennes globales d'efficacité relatives des souches étaient de 85.8% et 88.0% pour Ma456, contre 77.9% et 85.7% pour Bb734. Les essais au chlorpyrifos n'ont pas montré d'effet significatif sur l'amélioration de l'efficacité de la formulation fongique.

Effets sur les populations auxiliaires

La littérature fournit peu d'informations sur le sujet, et ce, probablement par manque d'expérimentation. Jjezzar (2007) aborde ce problème en étudiant l'impact du biopesticide "Green muscle" sur quelques espèces de biocénose aquatique " et a en particulier comparé la toxicité de plusieurs insecticides avec celle de *Metarhizium flavoviride*. Les résultats ont montré une faible toxicité sur la faune aquatique et les invertébrés sauvages utiles de la région de El Harrach, contrairement à plusieurs insecticides.

Formulations et viabilité des conidies

Les résultats des tests réalisés en plein champs ont déterminé que les conidies appliquées telles que n'avaient pas une efficacité significative. Diverses formulations ont ainsi été élaborées afin de maximiser leur viabilité dans l'agrosystème. Leur sensibilité aux UV peut être palliée avec des formulations incluant des huiles végétales notamment. De plus les caractéristiques hydrophobes augmentées par ce mélange optimise la fixation

⁴ Produit phytosanitaire appartenant à la famille des organochlorés, organophosphorés et utilisé dans la lutte conventionnelle contre les pucerons, certaines chenilles ou acariens.

des conidies sur la cuticules des insectes, cette dernière étant aussi hydrophobe (Alves et al. 1998 ; Moore et al. 1993). L'utilisation combinée de différentes espèces de champignons entomopathogène, permet aussi de réduire les risques de développement de résistances chez les insectes cibles.

• *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*

Les formulations du commerce proposent souvent des combinaisons de *M. anisopliae* et de *B. bassiana*. L'avantage de ce mélange est leur efficacité sur une plus grande plage de température et d'hygrométrie. *B. bassiana* étant à son optimum d'activité à 25°C, et 35°C pour *M. anisopliae*. (Shi et Al. 2008) (Bugeme et Al. 2008).

Conclusion

L'utilisation champignons entomopathogènes en lutte biologique est une technique qui reproduit en quelque sorte les phénomènes écosystémiques. Ces nouvelles alternatives semblent être plus que concluantes, compte tenu des résultats présentés dans les divers essais relevés dans ce travail. Certes, des connaissances plus approfondies sont requises pour l'utilisation de ces champignons dans les cultures, mais les souches sont nombreuses et présentes partout dans l'environnement. L'utilisation de champignons entomopathogènes en productions agricole permettrait de maintenir les populations de ravageurs au-dessous d'un seuil économique de dégâts. Il est souhaitable que de plus amples études soient menées pour mesurer les effets sur l'entomofaune non ciblée lors des traitements, car cette dernière est indispensable si l'on veut préserver une biodiversité, support de stabilité et de robustesse des agrosystèmes.

Bibliographie

- (1). Alves R.T., Batman R.P., Prior C et Leather S.R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop. Prot.* 17: 675-679.
- (2). Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bareman R.P et Prior C.(1993). Ultra-violet radiation damage *Metarhizium flavoviride* conidia sunscreens. *Ann.Appl. Biol.* 122† / 605-616.

- (3). St Leger R.J.(1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In :Parasites and pathogens of insects :Beckage NE, Thompson SN,(eds),Federici BA (eds.).Academic Press Inc.,New York,USA .2†: 211-225.
- (4). Alves R.T., Batman R.P., Prior C et Leather S.R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Prot.* 17: 675-679.
- (5). Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bareman R.P et Prior C.(1993). Ultra-violet radiation damage *Metarhizium flavoviride* conidia sunscreens. *Ann.Appl. Biol.* 122† / 605-616.
- (6). TOURE, Mamour, and Mady Ndiaye. 2010. "Efficacité Comparée de *Metarhizium Anisopliae* (Hypocreale: Clavicipitaceae) Sur Les Différents États Biologiques Du Criquet Sénégalais: *Oedaleus Senegalensis* (Orthoptères: Acrididea)." *Afrique SCIENCE* 6 (3): 10.11.2017
- (7). Chelvi, C. Thamarai, W. Richard Thilagaraj, and R. Nalini. 2011. "Field Efficacy of Formulations of Microbial Insecticide *Metarhizium Anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the Control of Sugarcane White Grub *Holotrichia Serrata* F (Coleoptera: Scarabidae)." *Journal of Biopesticides* 4 (2). 10.11.2017.
- (8). EKESI, S., N. K. MANIANIA, and K. AMPONG-NYARKO. 1999 (June). "Effect of Temperature on Germination, Radial Growth and Virulence of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* on *Megalurothrips Sjostedi*". 10.11.2017
- (9). Bugeme, David Mugisho, Markus Knapp, Sunday Ekesi, Adenirin Chabi-Olaye, Hamadi Iddi Boga, and Nguya Kalemba Maniania. 2015. "Efficacy of *Metarhizium Anisopliae* in Controlling the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus Urticae* on Common Bean in Screenhouse and Field Experiments." *Insect Science* 22 (1): 11.10.2017
- (10). TOURE, Mamour, and Mady Ndiaye. 2010. "Efficacité Comparée de *Metarhizium Anisopliae* (Hypocreale: Clavicipitaceae) Sur Les Différents États Biologiques Du Criquet Sénégalais: *Oedaleus Senegalensis* (Orthoptères: Acrididea)." *Afrique SCIENCE* 6 (3): 10.11.2017
- (11). Hallsworth, John E., and Naresh Magan. 1999. "Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria Bassiana*, *Metarhizium Anisopliae*, and *Paecilomyces Farinosus*." *Journal of Invertebrate Pathology* 74 (3):261-66. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4883>.
- (12). Milner, Richard J. 2000. "Current Status of *Metarhizium* as a Mycoinsecticide in Australia." *Biocontrol News and Information* 21 (2):47N-50N. 10.12.2017
- (13). Zimmermann, Gisbert. 1982. "Effect of High Temperatures and Artificial Sunlight on the Viability of Conidia of *Metarhizium Anisopliae*." *Journal of*

Invertebrate Pathology 40 (1):36–40.
10.12.2017

- (14). EKESI, S., N. K. MANIANIA, and K. AMPONG-NYARKO. 1999 (June). "Effect of Temperature on Germination, Radial Growth and Virulence of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* on *Megalurothrips Sjostedti*". 10.11.2017
- (15). Hassan, A. E. M., R. J. Dillon, and A. K. Charnley. 1989. "Influence of Accelerated Germination of Conidia on the Pathogenicity of *Metarhizium Anisopliae* for *Manduca Sexta*." *Journal of Invertebrate Pathology* 54 (2):277–279.10.11.2017
- (16). Wang, Chengshu, and Raymond J. St Leger. 2007. "The MAD1 Adhesin of *Metarhizium Anisopliae* Links Adhesion with Blastospore Production and Virulence to Insects, and the MAD2 Adhesin Enables Attachment to Plants." *Eukaryotic Cell* 6 (5):808–16. 10.11.2017
- (17). Kleespies, R. G., and G. Zimmermann. 1992. "Production of Blastospores by Three Strains of *Metarhizium Anisopliae* (Metch.) Sorokin in Submerged Culture" 2 (January):127–35. 10.11.2017
- (18). Shi, W.-B. (2008). The effect of combined application of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the release of predatory mite *Phytoseiulus longipes* for the control of the spider mite *Tetranychus evansi* on tomato. *Crop Prot.* 90, 49–53.



*Ralstonia
solanacearum*
le nouveau fléau
de l'agriculture
vivrière
agriculteurs

David Bollier, Laetitia Scheidegger, Emilie
Favre & Alessia Mercado

De la vallée du Mékong aux plaines arides d’Australie, en passant par l’Afrique centrale, une épidémie bactérienne sévit sur les cultures vivrières. Les paysans observent leurs plants de tomate pourrir et restent impuissants face à ce fléau. Cette nouvelle maladie a fait son entrée en janvier 2017 en Suisse. Agroscope sonne l’alarme. Que sait-on de cette bactérie ? Quelles sont les solutions connues à ce jour contre ce pathogène des cultures ? Ce sont les questions auxquelles nous tentons quelques réponses.

***Ralstonia solanacearum*, un nouveau fléau de l’agriculture vivrière mais pas seulement**

Cette bactérie du sol, cultivable sur milieu synthétique (Figure 1), est l’un des organismes pathogènes les plus importants au plan mondial. Elle figure en deuxième place sur la liste des maladies phytopathologiques d’importance économique et scientifique (Nion and Toyota, 2015). C’est l’agent du flétrissement bactérien, elle affecte particulièrement les Solanacées sous des noms divers (la pourriture brune de la pomme de terre, la maladie de Granville du tabac, le flétrissement bactérien de la tomate, etc.) et les bananiers (la maladie de Moko).

Ralstonia solanacearum forme en réalité un complexe d’espèces. Sa grande variabilité est due à l’existence de souches qui diffèrent, entre autres, par leurs hôtes ; plus de 250 espèces dans 53 familles botaniques. Il existe une classification physiologique (sans valeur taxonomique) qui définit le pathogène en 5 races distinctes (Cellier, 2010) :

- **Race 1** : pathogène des Solanacées, du tabac, de l’arachide, de l’olivier, de la fraise, des bananiers à génotype diploïde, et du genre *Geranium* et *Pelargonium* ; c’est la souche la plus ubiquiste. La race 1 comporte de nombreuses souches isolées dans de nombreuses régions et sur des hôtes divers. La définition de cette race pose problème, car certaines souches sont hautement virulentes sur tomate et aubergine, mais très peu virulentes sur tabac.

- **Race 2** : pathogène des bananiers tripléides dans les zones tropicales. Le flétrissement bactérien causé par la race 2 est désigné sous le nom de « Maladie de la Moko ».

- **Race 3** : pathogène de la pomme de terre, de la tomate et des mauvaises herbes, appartenant à la famille des

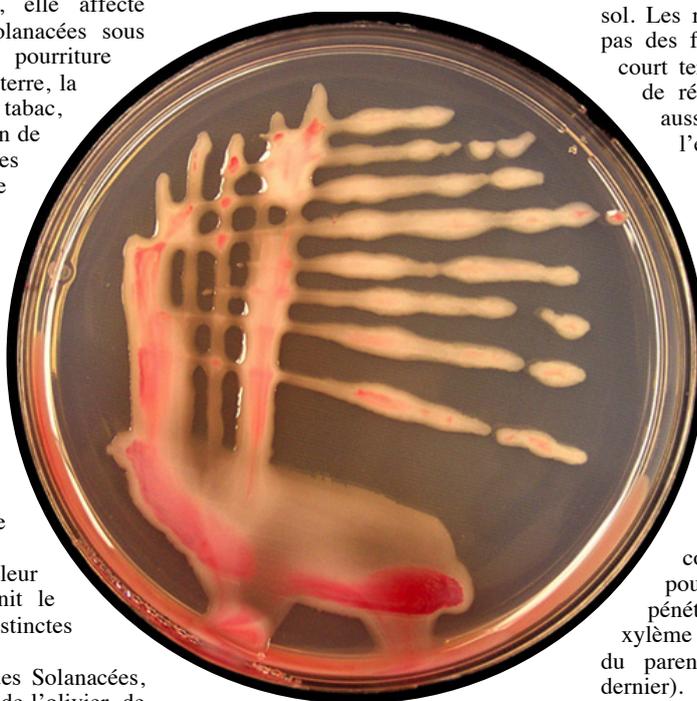
Solanacées. Elle est présente en conditions tempérées.

- **Race 4** : pathogène du gingembre.

- **Race 5** : pathogène du mûrier.

Cette bactérie présente un risque élevé de dissémination et de dégâts à d’autres cultures, que ce soit sous serre ou en plein champ, il est donc impératif que cette bactérie soit officiellement combattue et éradiquée dès son apparition. *Ralstonia solanacearum* est un organisme de

Figure 1 *Ralstonia solanacearum*
Source : <https://imgur.com>



quarantaine : en cas d’attaque, l’annonce est obligatoire auprès des services phytosanitaires. Les plantes atteintes ou suspectes ne doivent en aucun cas être déplacées.

Sa distribution est mondiale, mais cet organisme est surtout présent dans les régions tropicales, semi-tropicales et tempérées chaudes. Elle sévit avec gravité dans de nombreux pays d’Asie, d’Amérique et d’Afrique et elle est, maintenant, bien installée en Europe, où on assiste à l’apparition de foyers impliquant de nouvelles espèces végétales et de nouvelles souches tropicales. En Suisse, on a identifié un foyer pour la première fois en janvier 2017 dans des serres horticoles : une souche tropicale (race 1) a été

importée des Pays-Bas avec des porte-greffes de rosier.

Cycle biologique

Ralstonia solanacearum se développe sous une forme infectieuse dans une plante hôte, mais aussi sous une forme latente dans une plante non-hôte. Cette bactérie est capable de survivre sous une forme saprophyte. Dans le sol, elle se maintient sans peine jusqu’à 30 cm de profondeur, durant plusieurs années.

L’humidité et la température favorisent la survie de *R. solanacearum* dans le sol. Les ressources nutritives ne sont pas des facteurs limitant sa survie à court terme, car la bactérie dispose de réserves lipidiques. Elle peut aussi facilement survivre dans l’eau.

La bactérie pénètre la plante par les blessures occasionnées, soit lors de la croissance du système racinaire (au niveau du point d’émergence des racines secondaires), soit par des piqûres et altérations causées par les nématodes à galles, des morsures d’insectes, etc.) ou causées par des outils aratoires. Ces blessures, dans un sol contaminé, constituent des portes d’entrée pour la bactérie et facilitent sa pénétration dans les vaisseaux du xylème (ainsi que dans les cellules du parenchyme en bordure de ce dernier).



Figure 2 Symptômes vasculaires chez la tomate Source : <https://www.invasive.org/>

La dissémination a lieu quand les bactéries sont libérées depuis les racines d’une plante infectée. Elles gagnent le sol, puis les racines saines

des plantes voisines. La dissémination de *R. solanacearum* a lieu par l'intermédiaire de l'eau de ruissellement, de plants contaminés et d'outils aratoires. Il semblerait qu'elle puisse aussi être transmise par les semences. Les conditions favorables à son développement sont les températures entre 25 et 35°C. Les sols humides et lourds, au pH modéré lui sont aussi favorables. Elle supporte mal les sols secs et les températures inférieures à 10°C.

Symptomatologie

Le symptôme principal de *Ralstonia solanacearum* sur la tomate se manifeste par un flétrissement rapide des jeunes feuilles aux moments les plus chauds de la journée.

Au début de l'infection, le flétrissement est souvent réversible durant la nuit. Par la suite, il devient permanent. Ceci est dû à une interruption de l'alimentation en eau, les bactéries, ayant colonisé l'intérieur des plantes, obturent les vaisseaux conducteurs (Figure 2). Les tissus infectés se dessèchent et se nécrosent, induisant un fort taux de mortalité des plantes.

Des symptômes moins typiques peuvent se manifester : croissance ralentie des plantes, épinastie foliaire (courbure des feuilles vers le bas), émission d'ébauches de racines adventives sur la tige ou jaunissement des feuilles basses. Les fruits ne sont pas sujets aux symptômes.

Diagnostic

Comme *R. solanacearum* infeste son hôte par le système vasculaire, une coupe longitudinale dans les racines ou la tige peut permettre de constater une coloration jaunâtre à brune plus ou moins foncée. En fin d'évolution de la maladie, la moelle et le cortex peuvent présenter des lésions humides et brunes.

Pour différencier l'attaque de *R. solanacearum* de celle d'un champignon vasculaire, une méthode très simple permet de faire un diagnostic complémentaire. Elle consiste à prélever un fragment de tige dans les étages inférieurs et à l'immerger dans un verre d'eau : dans les 5 minutes apparaissent des volutes blanches constituées de milliards de bactéries (la maladie avait pour premier nom la « maladie du fil », due à cette propriété). Il existe aussi des tests rapides basés sur l'immunochromatographie ou l'amplification non instrumentée.

Possibilités de la lutte microbiologique contre *Ralstonia solanacearum*

L'apparition de résistances chez les organismes et les dommages causés à l'environnement et à la santé humaine mettent en exergue les limites de la lutte chimique. En réponse, la lutte biologique permet d'implanter un organisme antagoniste de façon permanente et d'alimenter un agroécosystème qui régule les pathogènes sur le long terme tout en réduisant les intrants chimiques. Les maladies sont gérées de façon écologique et durable, par des mécanismes biologiques comme la compétition, le parasitisme, ou la prédation (Huang et al., 2017).

Pour ces raisons de nombreuses recherches ont été menées en lutte microbiologique contre *R. solanacearum*. Entre 2015 et 2017, la majorité des études ont été menées par des universités chinoises, indiennes et japonaises : des pays où l'épidémie fait rage. Les agents de lutte biologique connus sont à 90 % des bactéries, le 10% restant est représenté par des champignons antagonistes. Les mécanismes de la lutte biologique contre *R. solanacearum* sont basés principalement sur la compétition pour l'espace (colonisation de la rhizosphère). La compétition pour les nutriments, le parasitisme ou la libération d'antibiotiques sont aussi des mécanismes utilisés.

Bactéries

Il existe de nombreuses bactéries connues pour leurs effets antibiotiques contre *R. solanacearum*. Les espèces les plus prometteuses appartiennent aux genres *Bacillus* et *Streptomyces*. L'espèce *Serratia marescens* est aussi efficace. D'autres espèces appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Burkholderia* et *Paenibacillus* sont maintenant étudiées (Yuliar et al., 2015). Certaines bactéries présentent en plus un effet biostimulant et permettent d'augmenter le rendement de la culture. Les traitements sont, en général, composés d'une ou plusieurs bactéries parfois associées à un biostimulant organique ou un engrais.

Les bactéries endophytes (qui accomplissent leur cycle à l'intérieur d'une plante), colonisent la même niche écologique que *R. solanacearum*. Elles sont des agents de lutte très intéressants contre le flétrissement bactérien comme *Bacillus amyloliquefaciens* Bg-C31 qui produit une protéine antimicrobienne LCI (Eljounaidi, Lee, et Bae 2016).

D'autres bactéries comme *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* et *Streptomyces virginiae* agissent sur les sidérophores (chélateurs de fer synthétisés et sécrétés par les micro-organismes pour leur permettre de puiser le fer) ou produisent des agents antimicrobiens (Eljounaidi et al., 2016), (Kumar Jayanna and Umeha, 2017). Des études montrent que les sidérophores joueraient un rôle clé dans la protection de l'hôte contre les infections bactériennes (Vaulont et Schalk, 2015).

Au sein des populations de certaines bactéries Gram-, l'expression des gènes de pathogénèse est contrôlée à travers le mécanisme de détection du quorum (Quorum sensing QS). Une des fonctions régulées par le Quorum sensing est la virulence des bactéries.

Il se trouve que certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* Zapa produisent des enzymes qui dégradent ces molécules signalétiques. Face à *R. solanacearum*, ces enzymes montrent une inhibition de la formation du biofilm. Ce mécanisme appelé Quorum Quenching (désactivation du quorum) est une piste intéressante pour le contrôle de la virulence bactérienne (Kumar Jayanna et Umeha, 2017 ; (Yuliar et al., 2015) La bactérie *Chryseobacterium nankingense* peut contrôler *R. solanacearum* grâce à une colonisation efficace du système racinaire du plant de tomate. Des expériences in vitro ont montré que la souche WR21 inhibe la croissance du pathogène. Une corrélation a été observée entre le développement de la souche WR21 et la suppression du flétrissement bactérien. Cette bactérie représente donc un agent de lutte biologique par compétition de l'espace au niveau de la rhizosphère, où la plante libère des exsudats carbonés dont les bactéries raffolent (Huang et al., 2017).

Des bactéries du genre *Lactobacillus* sont également étudiées. Les lactobacilles sont présents dans le sol, l'eau, les plantes et les animaux. C'est un des groupes importants de bactéries du microbiote humain. Elles servent aussi à la production de nos aliments fermentés en acidifiant le substrat et en inhibant ainsi la croissance d'autres organismes. Une espèce, *Lactobacillus casei*, a été étudiée pour sa capacité à produire des enzymes liés à la défense chez les plants de tomate. Le traitement se fait par l'application du lactobacille sur les semences de tomates. Les résultats de l'étude montrent une augmentation de la production générale de 15%. Les résultats sur le terrain ont montré une diminution de l'infestation par *R.*

solanacearum de 60% (Konappa et al., 2016).

L'efficacité des bactéries antagonistes ne peut pas être garantie en plein champ, comme pour *Bacillus subtilis*, car les paramètres tels que la température et les interactions avec les autres microorganismes sont très variables.

Méthodes d'inoculation

Il existe différentes manières d'appliquer les agents de lutte biologique : l'enrobage des semences, l'arrosage du sol avec des bactéries en solution ou le trempage des racines. La méthode la plus efficace est l'arrosage du sol. Une nouvelle méthode propose de désinfecter le sol en appliquant un substrat relâchant des composants volatiles (aussi appelée fumigation, cette méthode est sujet à controverse). L'efficacité est améliorée si l'inoculation est combinée avec des amendements organiques (déchets

La lutte microbiologique ne peut pas se faire n'importe comment.

En Chine, des études se concentrent sur des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (Ge et al. 2017). Ces bactéries ne sont pas autorisées par les législations d'Europe et des États-Unis, car elles sont pathogènes pour l'homme (Essoh 2013) et peuvent être potentiellement utilisées comme une arme biologique. Certaines études préconisent la lutte biologique (Debord et al. 2002) avec des souches de *Ralstonia solanacearum* non virulente, mais le risque que ces bactéries mutent et récupèrent la souche virulente est grand (Yuliar, Nion, et Toyota 2015). Les bactéries *Bacillus spp* sont également à manipuler avec précaution. *Bacillus cereus* pourrait potentiellement transmettre son gène virulent responsable d'intoxications alimentaires chez l'homme.

végétaux, fumier ou composés organiques simples). Champignons
Des champignons tels que *Glomus versiforme* protègent la rhizosphère contre les infections bactériennes. D'autres champignons comme *Pythium oligandrum* affaiblissent les parois cellulaires de *R. solanacearum*. Le lichen *Parmotrema tinctorum* pourrait être un agent de biocontrôle (Yuliar et al., 2015).

Podovirus

Une autre piste de lutte contre *R. solanacearum* a été explorée avec les podovirus. Parmi les souches testées,

le podovirus de type T7 souche ΦRSB2 a réussi à infecter *R. solanacearum*, mais la persistance du virus et les effets de celui-ci sur la plante n'ont pas encore été démontrés (Kawasaki et al., 2016).

Contraintes de la lutte microbiologique contre *R. solanacearum*

Certains agents de contrôle biologique sont exclus d'office, car ils diminuent les rendements.

Le facteur déterminant pour l'efficacité des agents de contrôle biologique est le taux de colonisation des racines. Parfois, des mutations s'opèrent au sein des colonies et les bactéries perdent leur compétitivité face à *R. solanacearum*. Certains vont même jusqu'à prétendre que les pathogènes développeront des résistances contre les organismes antagonistes de la même manière qu'avec les produits phytosanitaires de synthèse (Eljounaidi, Lee, et Bae 2016).

Pour améliorer la lutte contre *Ralstonia solanacearum*, certains laboratoires recommandent :

- d'identifier les gènes utilisés pour pénétrer, infecter et survivre dans la plante (approche génomique)
- de s'intéresser aux organismes qui pourraient être compétitifs en termes de colonisation racinaire contre *R. solanacearum*
- d'utiliser la technologie de la fluorescence au GFP pour tracer la colonisation de *R. solanacearum*
- d'utiliser des plantes modèles comme *Arabidopsis thaliana* pour gagner en temps et en efficacité
- d'évaluer l'ampleur des hôtes asymptomatiques

Et en dehors de la lutte biologique ?

Afin de réduire l'incidence ou la sévérité des épidémies de *R. solanacearum*, il s'agit de combiner différentes méthodes de lutte à différentes échelles :

La sélection de variétés résistantes est difficile en raison de la diversité des souches du pathogène. Des mesures prophylactiques simples peuvent par contre être appliquées : choisir des plants sains, limiter les sources de contamination et désinfecter le matériel agricole (irrigation, entrepôts de stockage et de transformation, plantes non cultivées dans les parcelles). D'après une étude, le fumier d'animaux de rente entrave également le développement de *R. solanacearum*. L'application d'acides aminés, de sucres et de composés organiques simples permet de modifier la diversité bactérienne et d'augmenter la compétition entre les

microorganismes du sol. L'épandage d'eau bouillante, l'usage de bâche en plastique transparent, les traitements thermiques, une meilleure gestion de l'humidité des sols ou encore l'usage de champs magnétiques sont autant de méthodes alternatives peu coûteuses qui diminuent la population de *R. solanacearum* (Yuliar et al., 2015).

Si l'organisme pathogène est déjà présent sur le territoire, voici quelques conseils de lutte (Eljounaidi, Lee, et Bae 2016):

- Élimination systématique des plantes hôtes
- Décalage des cultures dans le temps afin d'éviter les périodes sensibles, souvent liées à une forte chaleur et une forte humidité
- Décontamination des sols par solarisation
- Lutte chimique : inefficace, la plupart des produits sont interdits aujourd'hui.
- Une meilleure rotation des cultures

L'huile de bourgeon de Lila, *Syringa oblata*, diluée dans une solution avec 95% d'éther a la capacité de faire disparaître le flagelle de *R. solanacearum* et de diminuer la production de protéines. Le principe actif du Lila est l'eugénol qui est également présent dans le clou de girofle, la cannelle et d'autres épices (Bai et al., 2016).

Conclusion

Ralstonia solanacearum cause des dégâts et donc des pertes colossales, ce qui suscite des nombreuses propositions de solutions en lutte prophylactique, biologique, physique ou chimique. Le défi sera de trouver des solutions adaptées aux cultures de plein champ et aux caractéristiques pédoclimatiques de chaque région affectée, qui soient facilement applicables pour le producteur. Dans un contexte mondial de crise, où la sécurité alimentaire est menacée par de nombreux facteurs comme le réchauffement climatique, la dégradation des sols et l'arrivée de nouveaux pathogènes, il est important de garder en mémoire les leçons que nous ont livrées l'histoire et les échecs de la lutte chimique. Diminuer l'expansion de *Ralstonia solanacearum* nécessitera de nombreuses connaissances techniques, mais la gestion plus globale de l'agroécosystème avec des méthodes écologiques et durables comme la lutte biologique et la production intégrée serait un véritable atout contre *R. solanacearum*.

David Bollier, Laetitia Scheidegger, Emilie Favre & Alessia Mercado

7. Bibliographie

- Bai, W., Kong, F., Lin, Y., Zhang, C. (2016). Extract of *Syringa oblata*: A new biocontrol agent against tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* *134*, 79–83.
- Cellier, G. (2010). Description des écotypes du phylotype II dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*: diversité et évolution. Université de la Réunion.
- Eljounaidi, K., Lee, S.K., Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biol. Control* *103*, 62–68.
- Huang, J., Wei, Z., Hu, J., Yang, C., Gu, Y., Mei, X., Shen, Q., Xu, Y., Riaz, K. (2017). *Chryseobacterium nankingense* sp. nov. WR21 effectively suppresses *Ralstonia solanacearum* growth via intensive root exudates competition. *BioControl* *62*, 567–577.
- Kawasaki, T., Narulita, E., Matsunami, M., Ishikawa, H., Shimizu, M., Fujie, M., Bhunchoth, A., Phironrit, N., Chatchawankanphanich, O., Yamada, T. (2016). Genomic diversity of large-plaque-forming podoviruses infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Virology* *492*, 73–81.
- Konappa, N.M., Maria, M., Uzma, F., Krishnamurthy, S., Nayaka, S.C., Niranjana, S.R., Chowdappa, S. (2016). Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. *Sci. Hortic.* *207*, 183–192.
- Kumar Jayanna, S., and Umesha, S. (2017). Quorum quenching activity of rhizosphere bacteria against *Ralstonia solanacearum*. *Rhizosphere* *4*, 22–24.
- Nion, Y.A., and Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* *30*, 1–11.
- Vaulont, S., Schalk, I. (2015) Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. *médecine/sciences* *31*, 756–763.
- Yuliar, Nion, Y.A., Toyota, K. (2015). Recent Trends in Control Methods for Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* *30*, 1–11.
- Zhang, F., Zhang, W., Li, M., Yang, Y., Li, F.-M. (2017). Does long-term plastic film mulching really decrease sequestration of organic carbon in soil in the Loess Plateau? *Eur. J. Agron.* *89*, 53–60.

Autres sources

<http://ephytia.inra.fr/fr/C/5047/Tomate-Ralstonia-solanacearum-fletrissement-bacterien>
<https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/fr/home/themes/production-vegetale/protection-vegetaux/service-phytosanitaire-agroscope/quarantaeneorganismen/brunfaeule-ralstonia.html>

Le taupin, un ravageur qui a la patate

Le taupin, connu sous le nom ver fil-de-fer, est un coléoptère ravageur de culture. Les stades larvaires causent des pertes importantes à de nombreux producteurs. En s'attaquant aux tubercules et aux racines, le taupin réduit la qualité et le rendement. Aucun moyen de lutte directe efficace n'est à disposition, car les substances chimiques ont progressivement été interdites. La réduction des populations de ver fil-de-fer devient alors un véritable casse-tête. Cependant, la lutte microbiologique est en plein essor et des champignons entomophages ont été testés avec succès dans les laboratoires.

Les taupins causent des dégâts dans de nombreuses cultures, dont principalement la pomme de terre, le maïs et le blé. Le rendement n'est menacé qu'en cas de forte population. Dès que les larves s'attaquent aux tubercules, les pommes de terre deviennent invendables et les pertes engendrées sont lourdes pour les producteurs. En Suisse, trois espèces sont connues : *Agriotes obscurus*, *A. lineatus* et *A. sputator*. Pouvant se trouver sur une même surface, la présence de deux à trois espèces rend difficile la gestion

prometteur pour l'avenir. Ces champignons ont démontré la capacité de réduire efficacement le nombre de taupins, permettant d'allier lutte phytosanitaire et écologie.

Cycle de vie

La larve du taupin a besoin de 3 à 6 ans pour atteindre le stade adulte.

Cela dépend de l'espèce. Cependant, le réchauffement climatique risque inévitablement d'accélérer le processus. Le stade larvaire est entièrement endogé (faune



Figure 1 Une larve de taupin sur une patate (Parts 2015)

des ravageurs. Lorsqu'une mesure est appliquée, elle aura certes un effet sur une espèce, mais pas sur les autres qui possèdent un cycle biologique différent. Le ver fil-de-fer passe plusieurs années dans le sol avant d'émerger sous forme adulte, selon l'espèce. C'est pendant cette période que les dégâts sont occasionnés et qu'il faut agir. Il se déplace peu, mais sa qualité de fouisseur lui permet de se protéger en profondeur. Les méthodes de lutte chimique étant impossibles, il est nécessaire de développer une stratégie biologique. L'usage de champignons entomophages, comme *Metarhizium anisopliae* et *M. brunneum*, semble être

qui se trouve à l'intérieur du sol). Pondue à la fin du printemps, les œufs et les jeunes larves ont besoin d'humidité pour leur survie. La femelle choisit donc de préférence un couvert végétal pour s'y installer. L'œuf prendra 15 à 45 jours pour éclore, en fonction de la température. Les dégâts débutent le premier printemps suivant l'éclosion. Le développement de la larve compte une dizaine de stades. Les derniers deviennent très résistants aux conditions difficiles (manque d'eau ou de nourriture), rendant la lutte complexe. Il ne lui faut que quelques jours pour s'enfoncer à 70 cm de profondeur. Dès lors, il survivra sans peine plusieurs mois sans nourriture.

Il remontera rapidement avec des conditions favorables pour créer des dégâts inattendus.^{iv}

Dans l'idée d'effectuer des essais en laboratoire, l'élevage de taupin serait une solution, mais le procédé est complexe. Différents paramètres peuvent en être la cause. Un cannibalisme peut avoir lieu entre les larves. En nourrissant les larves abondamment et avec de plus petites populations, ce risque peut être évité. Les maladies fongiques semblent être la cause principale du décès des jeunes larves. La gestion de l'humidité de la terre est très importante : les œufs ne résistent pas à une baisse même très faible de l'état hygrométrique, et les jeunes larves sont aussi très sensibles au facteur humidité. La mortalité survient majoritairement lors des 2 premiers mois du stade larvaire avec un taux élevé. L'élevage se fait dans des contenants de dimension variable. Il existe deux techniques. L'élevage en pot est la méthode la plus largement utilisée et permet d'étudier un nombre d'individus assez important, leurs relations et leur coévolution. Une méthode d'élevage individuel permet d'étudier l'individu seul contrairement à la méthode des pots qui s'intéresse plus particulièrement aux populations. Elle consiste à placer une larve dans un mélange de terre placée dans un tube à essai afin d'observer comment il évolue. Cette technique permet de s'affranchir des problèmes de cannibalisme et de transmission de maladies. L'élevage, actuellement, sert à l'étude de la biologie des taupins. Mais les techniques restent encore insuffisantes pour les différents essais de méthodes de lutte.^v

Le taupin à la hausse

Le taupin n'est pas nouveau sur le territoire Suisse, mais les pertes de qualité causées par ce ravageur ont toutefois augmenté ces dernières années. Ceci est principalement dû à un accroissement de la population suite à l'interdiction de l'utilisation d'insecticides à large spectre. L'augmentation de la population est aussi due aux nouvelles pratiques culturales, comme le semis direct. À cause de cette méthode, les parcelles ne sont plus labourées. Les couverts végétaux, les surfaces enherbées et les jachères procurent de la nourriture en permanence aux vers fil-de-fer, facilitant leur développement. Dans les régions plus chaudes, d'autres

espèces ont été décrites, dont *Agriotes sordidus*. Sa larve a besoin de deux ans avant d'émerger au stade adulte. Cette espèce n'est pas présente en Suisse, mais sa venue pourrait impacter les rendements et la lutte par son cycle raccourci.^{vii}

Moyens de lutte actuels

La lutte contre les vers fil-de-fer repose principalement sur les méthodes de lutte indirecte, dont l'objectif est de limiter les pertes économiques en maintenant le taux de ravageurs en dessous du seuil de tolérance.



Figure 2 une larve attaquée par un champignon entomopathogène (Schweizer 2015)

La protection des cultures commence premièrement par le choix de la parcelle. Les vers fil-de-fer ont une affinité plus élevée pour les sols lourds, argileux et riches en matière organique. Il est donc judicieux, si le producteur a le choix, de cultiver les cultures à risque dans un sol léger. Le précédent cultural joue un rôle majeur sur la régulation des populations de taupin. Les ravageurs se développent rapidement dans les prairies artificielles pluriannuelles. Les experts de Swissspatat préconisent un délai d'attente de minimum trois ans (voire plus) entre le retournement d'une prairie et l'implantation d'une culture de pomme de terre. Le labour et une rotation adéquate sont ainsi utiles pour diminuer la pression des ravageurs, grâce à la perturbation de l'habitat et de la source de nourriture. Le travail du sol ne doit pas être pris à la légère. Pour éviter toute atteinte à sa structure, il faut veiller à un labour raisonnable et au moment adéquat. Les périodes optimales sont le début de saison (mars-avril) et la fin de l'été (août-septembre), car les vers remontent à la surface à ces moments. De plus, les larves fraîchement écloses à la fin de la saison estivale sont bien plus sensibles que leurs aînées.

En Suisse, la lutte directe est restreinte. Aucun produit n'est autorisé dans la culture de la pomme de terre biologiques ou en production intégrée. La lutte est cependant légale pour le traitement des semences des betteraves sucrières, des engrais verts et des céréales. Des néonicotinoïdes comme le Gaucho, le Poncho ou le Cruiser sont utilisés, évitant ainsi aux graines d'être grignotées.

Ces restrictions ont mené à l'utilisation de champignons entomopathogènes. Ces champignons parasitent les insectes et provoquent leur mort. La phase parasitaire

est suivie d'une phase saprophyte. Dans le cas du taupin, les espoirs reposent principalement sur le champignon *Metarhizium*.

Biologie de *Metarhizium*

Morphologie

Metarhizium est un genre appartenant à la division *Ascomycota*, caractérisé pour la plupart des espèces de ce genre par l'absence de production de spores sexuées. Le mycélium, formé d'hyphes septés, porte des conidiophores qui produisent des spores nommés conidies. Ces dernières sont vertes, ce qui crée une moisissure dite muscardine verte sur l'insecte, lorsque le champignon entre en sporulation.^{xii}

Action

Les champignons entomopathogènes ont la capacité de pénétrer dans l'insecte directement par leur cuticule. La spore se fixe sur la carapace de son hôte, germe puis envahit le corps de son hôte par des orifices naturels ou en perforant la paroi de chitine. Une production d'enzymes liée à une action mécanique est employée pour y parvenir. Ces enzymes Dès que le champignon a franchi cette barrière, il aura accès à l'ensemble de

l'organisme en passant par l'hémolymphe. En produisant des hyphes et des blastospores, la colonisation se fait rapidement. Afin de résister aux défenses de l'insecte, *Metarhizium* produit des toxines. La mort de l'hôte survient donc de deux causes. D'une part, la colonisation le vide de son énergie et de l'autre, les toxines l'empoisonnent progressivement. Suite à sa mort, des antibiotiques combattent l'arrivée des bactéries saprophytes, le champignon étant lui-même saprophyte à ce stade. La muscardine apparaît alors, constituée des conidiophores et d'hyphes. Leurs conidies peuvent ainsi être disséminées à la conquête d'autres ravageurs.^{xiii}

Facteurs

Pour que le champignon se développe rapidement, quatre facteurs entrent en compte. Le rayonnement solaire a un effet nocif sur les conidies. Un microhabitat, telle l'ombre d'un arbre, aura un effet bénéfique. Comme tout organisme vivant, la température a un impact sur la vitesse de développement. L'optimum se situe à 30°C, tandis qu'au-delà de 40°C, le champignon ne peut pas survivre. Bien que *Metarhizium* soit relativement tolérant à des conditions sèches, son efficacité est améliorée avec une humidité relative élevée. Enfin, le sol, en offrant la capacité de tamponner les variations de température et d'humidité, permet au champignon de s'installer et de se développer. De plus, le sol est une protection contre les UV. Le type de sol aura ainsi une influence sur sa survie.^{xiv}

Utilisation de *Metarhizium*

Lutte contre la larve

Le champignon entomophage *Metarhizium anisopliae* est connu depuis plusieurs années. Kabaluk (2005) a démontré l'obtention d'une forte mortalité sur différents vers fil-de-fer en laboratoire. En 2007, les essais en plein champ ont abouti à des taux de mortalité significatifs. L'efficacité des conidies en granulés est démontrée, avec en prime un effet répulsif constaté.^{xv}

Plus récemment, une souche de *M. brunneum* isolée en 2011 par Agroscope a montré un fort potentiel dans la lutte contre le taupin. En comparaison avec deux autres souches, Eckard (2014) est arrivé à la conclusion que la souche suisse est la plus efficace contre *A. obscurus* et *A. lineatus*, mais pas contre *A. sputator*.

Lutte contre l'adulte

La lutte contre l'adulte n'a été que peu

étudiée, en comparaison de la larve. Dans une étude de Kabaluk (2014), plusieurs

au taux d'infection par les conidies et donc également à la quantité de conidies



Figure 3 *Agriotes obscurus* (Schmidt 2016)

techniques d'application de *M. brunneum* (souche LRC112) ont été testées sur des taupins adultes (*A. obscurus*). Atomiser le champignon est intéressant, notamment pour une meilleure répartition des conidies, mais cependant, cette étude déduit que le moyen le plus efficace est l'utilisation de granulés porteurs du champignon (létaux à 44% après 8 jours et à 93% après 18 jours). La létalité du traitement mixte, avec des champignons couplés avec un insecticide (spinosad), ne se différencie pas de celle du champignon seul. L'auteur conclut que ce champignon est prometteur, mais qu'il faut augmenter le contact entre les insectes et les spores.

Kabaluk, en 2015, entreprend un nouveau travail en réutilisant les mêmes champignons, insectes et granulés, mais en cherchant à attirer l'insecte, par l'utilisation de phéromones. Le but est de réduire la quantité de conidies et de granulés. Cette stratégie augmente significativement la mortalité du taupin, les contacts champignons/insecte sont multipliés par 7 par l'utilisation de phéromones durant les 30 premières minutes de l'essai.

Ceux-ci provoquent une acquisition plus large et plus homogène du champignon et dans un laps de temps plus court. La mortalité est proportionnelle

sur les granulés. Néanmoins, la pluie rend inefficace le traitement.

Étant donné que le taupin est actif durant 2 mois, il faudrait permettre l'action du traitement pendant cette période, soit en agissant directement sur le support, en le rendant plus résistant et en augmentant sa longévité, soit en utilisant des champignons fortement transmissibles qui passeraient aisément d'un insecte à l'autre. Il est également intéressant de relever que l'utilisation de phéromones joue

un rôle réducteur sur le nombre d'accouplement. L'étude n'a, toutefois, pas défini la distance à laquelle ces granulés (avec phéromones) attirent les taupins.

La formulation du futur?

Afin de s'orienter dans le sol, les larves détectent le CO₂ émis par les racines. / Combiner l'application de conidies de *Metarhizium* sp. avec une source de dioxyde de carbone, permet de constituer un piège Attract & Kill. La source de CO₂ est un autre champignon bien connu, *Saccharomyces cerevisiae*, la levure du boulanger. Le ver leurré par *Saccharomyces cerevisiae*, croyant avoir affaire à une racine, sera infecté par le champignon entomopathogène. En plus de cela, l'encapsulation peut également être améliorée. Habituellement, le chlorure de calcium est utilisé, mais le gluconate de calcium peut être une alternative intéressante. En effet, le gluconate offre une meilleure survie aux champignons et améliore la durée de conservation du produit. L'efficacité est aussi favorisée par l'apport de nutriment (le gluconate étant une source de sucre). La croissance du mycélium et la production de CO₂ sont accélérées.

En bref

Résoudre le problème du ver fil-de-fer demande encore beaucoup de recherches. Que ce soit pour la formulation, la souche, l'application ou encore la conservation de *Metarhizium*, des progrès restent à venir. Le rôle des stations de recherche, notamment Agroscope, sera important. La solution résidera peut-être dans la maîtrise de l'élevage du taupin, facilitant ainsi les expériences.

Dylan Maret
Romain Salamin
Falc Zolling

Bibliographie

- N. Robin, P. Taupin, and J-P. Thibord, 'Lutte Contre Les Taupins', 2009.
- M. Traugott and others, 'Biology, Ecology, and Control of Elaterid Beetles in Agricultural Land', *Annual Review of Entomology*, 60 (2015), 313–334.
- F. Barsics, E. Haubruge, and F.J. Verheggen, 'Wireworms' Management: An Overview of the Existing Methods, with Particular Regards to *Agriotes* Spp. (Coleoptera: Elateridae)', *Insects*, 4.1 (2013), 117–152.
- G. Grabenweger, 'Moyens de Lutte Contre Le Ver Fil de Fer Dans La Culture Des Pommes de Terre', *Recherche Agronomique Suisse*, 6.11 (2015), 538–541.
- Edmond Guéniat, 'Contribution à l'étude Du Développement et de La Morphologie de Quelques Elatérides (Coléoptères)' (unpublished PhD Thesis, ETH Zurich, 1934).
- Muhammad Sufyan, Daniel Neuhoff, and Lorenzo Furlan, 'Larval Development of *Agriotes Obscurus* under Laboratory and Semi-Natural Conditions', *Bull Insectol*, 67 (2014), 227–235.
- U. Kölliker, L. Biasio, and W. Jossi, 'Potential Control of Swiss Wireworms with Entomopathogenic Fungi', *IOBC/Wprs Bull*, 66 (2011), 517–520.
- G. Grabenweger and others, 'Aktuelle Ansätze Zur Drahtwurmbekämpfung', 2015 <https://www.kartoffel.ch/fileadmin/redaktion/pdf/Branche/2__Drahtwurmbekämpfung_Ansaetze_G._Grabenweger.pdf> [accessed 13 December 2017].
- B. Arnold and J. Dugon, 'Vers Fil de Fer (Taupins)', 2014 <http://www.kartoffel.ch/fileadmin/redaktion/pdf/Branche/Merkblaetter/01_f_2014_A4_Taupins.pdf> [accessed 13 December 2017].



Interview avec Dr. Grabenweger, Agroscope

Quel est l'efficacité de la souche de *M. brunneum* que vous avez isolée?

Cela dépend de l'espèce de taupin. Notre souche est très efficace contre *Agriotes obscurus* et efficace contre *A. lineatus*. D'autres souches, comme la souche *Attracap*, sont, par exemple, plus efficaces contre *A. ustulatus*.

Quelle formulation est la plus efficace?

"L'ancienne" formulation est la meilleure. Les conidies sont cultivées sur un substrat d'orge stérilisé. Beaucoup de spores sont produits et sont bien adaptés à l'environnement.

La susceptibilité aux contaminations et la difficulté de standardiser le produit restent un problème majeur. De nouvelles formulations, comme des capsules, ne sont pas encore au point, mais pourraient être utilisées à l'avenir.

Quel est le meilleur moment d'intervention?

Cela dépend de la culture. Le meilleur moment de traitement n'est souvent pas encore établi.

Pour le maïs, c'est probablement au printemps, pendant le semis. Pour les patates, le traitement est plus intéressant l'année précédant la culture (nous testons actuellement cette méthode).

Comment produisez-vous *M. Brunneum*? Est-ce que la production est un facteur limitant?

Au laboratoire, la production se fait dans des sachets de culture ; la capacité est limitée. Mais la production n'est généralement pas un facteur limitant, comme le montre l'application de *Metarhizium* au Brésil. En ce moment, un projet de la Commission pour la Technologie et l'Innovation (CTI) cherche à établir une production à l'échelle industrielle dans une entreprise Suisse.

Allez-vous commercialiser un produit? Si oui, sera-t-il économiquement intéressant et une bonne alternative aux moyens de lutte actuels?

Oui, cela fait partie de projet CTI mentionné.

Avez-vous testé l'impact sur l'environnement et d'autres larves d'insecte?

Oui, cela fait aussi parti du projet CTI. Les résultats, par exemple des tests sur les carabes, ne sont pas encore disponibles.

Craignez-vous que des résistances puissent survenir?

Ce n'était pas le cas pour le moment, mais l'apparition de résistances ne peut pas être exclue.

Êtes-vous actuellement à la recherche d'autres souches de *M. brunneum* qui seraient éventuellement encore plus efficaces?

Oui, nous avons actuellement environ 50 souches qui devront être testées. De plus, des comparaisons avec d'autres souches, notamment européennes, sont prévues.

Est-ce qu'Agroscope continue la recherche dans ce sujet? Si oui, quels sont les objectifs?

Oui, le projet continue jusqu'en 2020, l'objectif étant la commercialisation d'un produit (projet CTI). La déposition d'un dossier d'enregistrement doit encore venir.

Quand allez-vous publier votre nouvelle recherche?

La prochaine recherche sur les "Non-targets" sera probablement publiée d'ici la fin 2018.

Traduit de l'allemand

suite Bibliographie

- C. Ritter and E. Richter, 'Control Methods and Monitoring of Agriotes Wireworms (Coleoptera: Elateridae)', *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120.1 (2013), 4–15.
- S. Breitenmoser, 'Vers Fil de Fer: Stratégies de Régulation Actuelles et Futures', 2013 <<http://www.bioactualites.ch/cultures/grandes-cultures-bio/pommes-de-terre/verfildefefer-regulation.html>> [accessed 13 December 2017].
- O. Benserradj, 'Evaluation de Metarhizium Anisopliae à Titre d'agent de Lutte Biologique Contre Les Larves de Moustiques', 2015.
- J. Hallsworth and N. Magan, 'Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi Beauveria Bassiana, Metarhizium Anisopliae, and Paecilomyces Fari-nosus', *Journal of Invertebrate Pathology*, 74.3 (1999), 261–266.
- J. T. Kabaluk and others, 'Metarhizium An-isopliae as a Biological Control for Wireworms and a Report of Some Other Naturally-Occurring Parasites', *IOBC/Wprs Bull*, 28.2 (2005), 109–115.
- J. Kabaluk, R. Vernon, and M. Goettel, 'Mortality and Infection of Wireworm, Agriotes Obscurus [Coleoptera: Elateridae], with Inundative Field Applications of Metarhizium An-isopliae', *Phytoprotection*, 88.2 (2007), 51–56.
- Grabenweger and others.
- J. Kabaluk, 'Targeting the Click Beetle Agriotes with Entomopathogens as a Concept for Wireworm Biocontrol', *BioControl*, 59.5 (2014), 607–16 <<https://doi.org/10.1007/s10526-014-9603-x>>.
- J. Kabaluk, J.-P. Lafontaine, and J. Borden, 'An Attract and Kill Tactic for Click Beetles Based on Metarhizium Brunneum and a New Formulation of Sex Pheromone', *Journal of Pest Science*, 88.4 (2015), 707–16 <<https://doi.org/10.1007/s10340-015-0661-3>>.

B. amyloliquefaciens : Aux racines de nos cultures

Interdiction progressive des substances phytosanitaires, prix croissant des intrants, besoins grandissants en nourriture d'un point de vue quantitatif et qualitatif...tels sont les défis agricoles du XXI^e siècle. Pour les relever, ces dernières années, la recherche se focalise de plus en plus sur les microorganismes du sol. Champignons, bactéries ou algues, ils sont des milliards à peupler la rhizosphère et à fournir un support de vie sain aux végétaux qui nous nourrissent. Comment des organismes aussi petits peuvent-ils avoir une telle influence sur les végétaux ? Quelles relations se mettent en place ? Mais plus concrètement quels sont les opportunités agronomiques qu'offrent ces phénomènes et quel est leur potentiel ? Gros plan sur *Bacillus amyloliquefaciens*, une des nombreuses bactéries présentes dans le sol, qui commence à peine à révéler son potentiel.

Introduction

La lutte microbiologique, une solution pour demain ?

Dans un contexte agricole en pleine effervescence, le changement se fait ressentir comme un besoin crucial. En effet, c'est toute la communauté scientifique qui alerte depuis plusieurs années : l'ère du tout chimique et minéral a atteint ses limites. Malgré une efficacité très élevée des produits chimiques contre les différents bio-agresseurs (ravageurs) et plantes adventices des cultures, il est urgent de revoir les pratiques agricoles. Les pesticides nuisent à l'équilibre des agro-systèmes (écosystème en milieu agricole) qui est d'une importance majeure pour assurer la stabilité du milieu et la durabilité de la production. On sait aujourd'hui que ces produits ont un impact sur l'environnement et la santé humaine. L'apparition de résistances est également un problème

important qui a tendance à faire augmenter les concentrations de matière active des pesticides. Que ce soit contre les mauvaises herbes, contre les insectes ou contre les pathogènes le constat est le même, la vie a une grande capacité d'adaptation. L'utilisation des produits chimiques devient alors discutable et très controversée. Des solutions alternatives existent et sont déjà en plein essor.

L'apparition de la production intégrée et biologique a propulsé la lutte biologique. Ceci s'explique par une demande toujours croissante du consommateur et donc du producteur de s'orienter vers une agriculture plus durable. La lutte biologique est séduisante par son efficacité, ainsi que plus respectueuse pour l'environnement et les organismes vivants qui le composent, notamment l'Homme. Elle a pour avantage de diminuer le risque d'apparition de résistances. De plus, elle est également intéressante par son faible coût de développement. Elle permet de restreindre la lutte chimique, parfois même l'éliminer.

La lutte microbiologique est une des stratégies de la lutte biologique. Elle consiste à utiliser des microorganismes antagonistes (champignon, bactérie, virus, etc...) pour contrôler des cibles nuisibles (insectes, champignons, plantes, bactéries, virus, etc...) ou promouvoir la croissance des plantes. Cette stratégie s'inspire des interactions que l'on retrouve dans la nature. Malgré les réticences du public et du législateur, les méthodes de lutte microbiologique ont déjà fait leur preuve et ont un avenir prometteur et il est important de sensibiliser le grand public. En général la lutte microbiologique a démontré son innocuité pour l'Homme et l'environnement. Avant d'homologuer un microorganisme, de nombreuses études d'impact et d'efficacité sont faites. L'impact sur la santé humaine est bien évidemment pris au sérieux. Il s'agit du premier critère évalué. S'il existe le moindre danger ou impact sur l'Homme, le projet est directement arrêté. Au sein de la lutte microbiologique on retrouve les agents de biocontrôle et les biostimulants. Il s'agit d'un marché mondial qui représente plus d'un milliard d'euros (3 millions d'hectares traité) en 2015 avec une croissance supérieure à 10 % par an.

Biostimulants et agents de biocontrôle
Ces deux termes, dans le monde de la microbiologie, sont parfois confondus

et mélangés. Et pourtant il y a de réelles différences au niveau théorique.

Agents de biocontrôle

Ce sont tous les organismes utilisés pour contrôler les nuisibles notamment en agriculture. Parmi eux, on distingue les macroorganismes et les microorganismes, qui nous intéressent ici... Il peut s'agir de champignons entomophages (qui se nourrissent d'insecte) ou mycoparasites d'autres champignons, et bactéries pathogènes, de champignons contre des adventices, de bactéries contre des insectes, de bactéries contre d'autres bactéries, des virus contre les insectes et bien d'autre forme d'interaction antagoniste-nuisible.

Biostimulants

Un biostimulant ou stimulateur de défense des plantes (SDP) est un produit qui stimule l'activité d'un organisme (végétal) ou son immunité. Ce ne sont pas des engrais en soit car ils contiennent en général peu de nutriments. Cette technologie peut avoir divers utilisations et buts. Elle peut être utilisée pour améliorer l'absorption des nutriments au niveau des racines (symbiose entre une plante et un champignon pour augmenter le volume de terre colonisée, bactéries qui modifient chimiquement l'environnement racinaire pour rendre des nutriments disponibles, etc...), pour induire les défenses de la plante de façon préventive face à un potentiel risque, pour aider une plante à se développer correctement même dans une situation de stress biotique (le vivant) ou abiotique (le milieu). On retrouve les biostimulants vivants et non vivants (concentrés d'algues, substances humique, minéraux, etc...).

Dans les biostimulants vivants peuvent être rangés les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP). Une rhizobactérie est une bactérie qui se développe dans la rhizosphère (environnement proche des racines et poils absorbants). La rhizosphère est un milieu très important pour les végétaux, c'est au sein de cette dernière que la majorité des échanges dans le sol s'effectuent (alimentation hydrique, respiration, alimentation minérale et autre processus chimique et biochimique complexe). Ces dernières peuvent aussi être placées dans les agents de biocontrôle mais sont souvent associées aux biostimulants pour des raisons

d'homologation moins fastidieuses, en termes de coûts et de durée de la procédure. On distingue deux grands groupes dans les RFCP :

Les bactéries phytostimulatrices

« Ses effets biostimulants et antagoniste sont utilisés à travers plusieurs produits et la recherche continue. »

qui peuvent agir sur le végétal de plusieurs manières : amélioration de l'absorption des nutriments ou fixation de l'azote, augmentation de la solubilité des nutriments, synthèse de phytohormone de croissance, favorise la croissance racinaire, augmente

amyloliquefaciens appartient à la fois à la catégorie des agents de biocontrôle et à celle des biostimulants. Cette bactérie a de multiples fonctions et est encore loin d'avoir montré toutes ses facettes

Bacillus amyloliquefaciens, bactérie à tout faire ?

Bacillus amyloliquefaciens de son nouveau nom *B. methylotrophicus* est une bactérie de type bacille (batônnet) Gram positive qui se cultive facilement bien sur milieu artificiel. Bactérie du sol, elle a été découverte en 1943 par un scientifique japonais qui l'a nommé *B. amyloliquefaciens* car elle produit un fluide (faciens) à base d'amylase (enzyme qui est responsable de l'hydrolyse de l'amidon en sucre simple). Elle a été récemment renommée *B. methylotrophicus* car elle est capable d'utiliser du méthanol (molécule d'alcool à un seul carbone, alcool de bois) comme source

sont utilisés à travers plusieurs produits. En effet, elle produit différents composés notamment antibiotique, une enzyme de restriction utilisée dans le domaine de la recherche médicale (BamH1). Parmi les substances antibiotiques des protéines comme par exemple la barnase, des molécules complexes comme le plantazolicin qui a une activité sélective sur d'autres espèces de Bacille (*B. anthracis*) ou encore des lipopeptides qui auraient également un effet immunostimulant et fongicide (Ongena, 2014). Elle a montré une activité fongicide sur différentes bactéries et champignons comme par exemples *Ralstonia solanacearum*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium* qui sont des agents importants de maladies. Elle est utilisée en agriculture, en hydroponique (culture hors sol sans substrat) et même en aquaculture. Elle a la capacité de coloniser rapidement l'environnement racinaire.

Commercialisation et homologation

Etant donné la polyvalence de cette bactérie on retrouve tout un nombre de produits homologués dans le monde aux noms, aux utilités et aux cibles différentes. Ils sont classés le plus souvent en tant que biostimulants mais aussi retrouvés en tant qu'agent de biocontrôle. La sous-espèce « *plantarum* FZB42 » de *Bacillus amyloliquefaciens* est très étudiée. Elle est déjà utilisée comme biostimulant et agent de biocontrôle en agriculture. Son génome mesure 3.918 Mb (mégabases), il contient 3693 séquences qui codent pour des protéines (Gerbore et al., 2016). La souche D747 de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* est homologuée en Suisse, on la retrouve dans le produit commercial « Amylo-X » qui est distribué par Andermatt Biocontrol AG (OFAG, 2018). Ce produit est utilisé contre la pourriture grise de la fraise, du poivron doux, de l'aubergine, de la tomate et contre le mildiou de la laitue. D'autres produits commerciaux proposent les souches B14, BF06, SQR9, FZB42, NBRI-SN13 ou SN13. Les possibilités de matières actives avec cette bactérie sont infinies, on peut la retrouver en complexe avec d'autres *Bacillus* comme par exemple *B. subtilis*, des agents fongiques ou tout simplement un mélange de différentes souches de *B. amyloliquefaciens*. Les chercheurs ont néanmoins quelques difficultés avec cette bactérie. Il s'emblerait que son activité ne soit pas toujours constante (Ongena, 2014). Elle peut

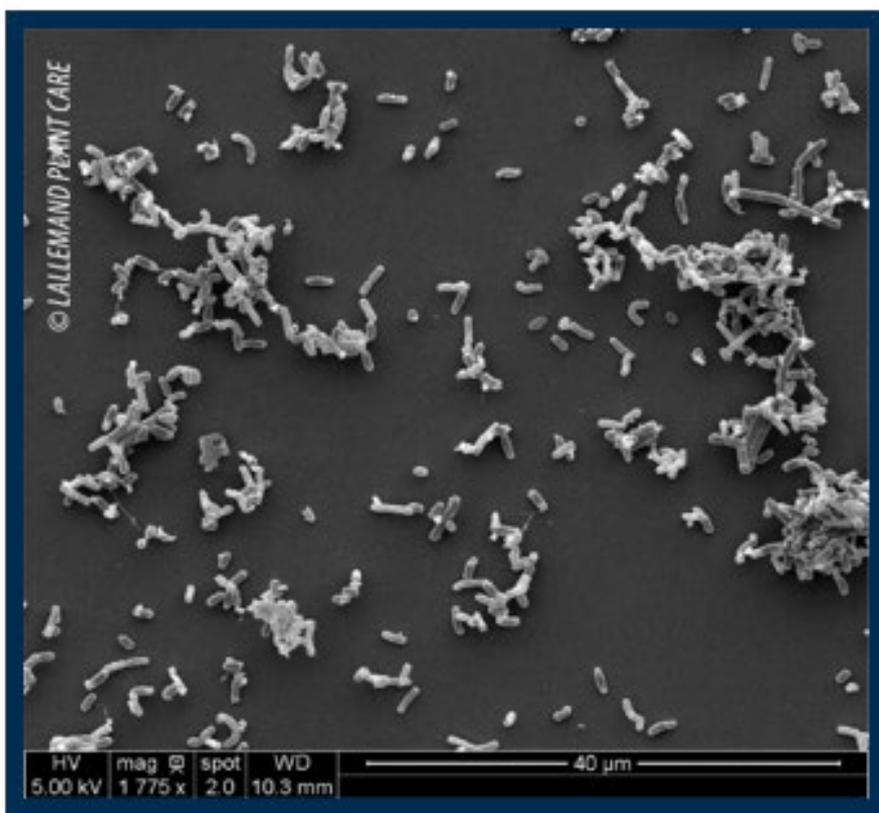


Image 1 : *B. amyloliquefaciens* vue au microscope électronique à balayage

les potentiels symbiotiques (association avec d'autres organismes ayant un effet positif).

Les bactéries phytoprotectrices

qui favorisent la croissance des plantes en réduisant le niveau de certaines maladies : compétitions pour les ressources, production d'antibiotiques, induction des défenses de la plante. Cette catégorie est étroitement liée à celle des agents de biocontrôle. La bactérie *Bacillus*

d'énergie, substance qui est normalement toxique pour les organismes vivants. On a longtemps pensé qu'il s'agissait de la même espèce que *B. subtilis*, mais des généticiens ont récemment démontré qu'il s'agit d'une espèce apparentée de cette dernière (Zhang et al., 2016). Elle est connue notamment en agriculture pour différentes vertus que l'on exploite maintenant dans le domaine de la microbiologie. Ses effets biostimulants et antagonistes

varier en fonction des facteurs de milieu, à savoir en fonction de la plante, du sol, du climat et autres composantes abiotiques et biotiques. De plus, il est important de savoir que les essais fructueux en laboratoire (in vitro) ne sont pas toujours suivis de résultats satisfaisants en champs (in situ). La production à grande échelle se réalise dans des fermenteurs (bioréacteurs), dont l'objectif est d'obtenir un produit extrêmement pur à partir de la fermentation. Colonisation des racines et impacts sur la rhizosphère

plante émet une forte quantité de substance attractive pour les rhizobactéries promotrices de croissance. La bactérie promotrice de croissance et bénéfique pour la santé de la plante peut avoir un contrôle sur les champignons, bactéries et nématodes qui attaquent la culture.

Biocontrôle

Le biocontrôle est l'ensemble des méthodes de protection des végétaux qui utilisent des mécanismes d'interactions entre organismes vivants. Il s'agit

cycliques appelées bacillomycine D et fengycine (Koumoutsi et al., 2004) ainsi que des molécules anti bactériennes appelées polyketides et bacilysine (Chen et al., 2006). *B. amyloliquefaciens* synthétise des protéines actives contre d'autres souches qui lui sont proches, on les appelle des bactéricines (Scholz et al., 2011, 2014). Pour que la bactérie soit vraiment efficace, une attention doit être portée à son mode d'application qui est un facteur prépondérant. Deux inoculations sont nécessaires : une avant et une après le

Components	Unit	LACTOFOL®	Components	Unit	LACTOFOL®
Lactic acid	%	10	Magnesium	%	0.1
Riboflavin	mg/l	0.5	Iron	%	0.4
Ascorbic acid	mg/l	3	Boron	mg/l	300
Thiamine	mg/l	0.1	Copper	mg/l	200
Nitrogen	%	30	Manganese	mg/l	250
Phosphorus	%	7.5	Zinc	mg/l	125
Potassium	%	15	Molybdenum	mg/l	18
Calcium	%	0.5	Cobalt	mg/l	6

Tableau 1 : Composition du LACTOFOL, donnée à titre indicatif

D'après Jha et al. (2017), on considère que le rapprochement entre la plante et la bactérie (mobile) est une première étape nécessaire avant de constater les effets bénéfiques de leur relation. Les colonies de la souche FZB42 ne se réunissent pas uniquement autour des racines. Selon l'espèce végétale colonisée, la bactérie s'installe sur différentes parties des racines : apex, segments supérieurs à l'apex, sous l'épiderme, sur le côté ventral de la feuille pour le cas de la lentille d'eau (*Lemna minor*). La présence de la bactérie près des poils absorbants est accompagnée d'une grande richesse d'exsudats racinaires, comme des acides organiques, des sucres. Ces exsudats servent entre autres à alimenter la flore bactérienne près des racines et permettent sa multiplication. Les bactéries attirées produisent des polysaccharides qui conduisent à l'apparition d'un biofilm. Dans cette matrice (le biofilm), les bactéries peuvent vivre en colonies indépendantes. Le plante peut favoriser ou réprimer la flore bactérienne par ses exsudats qui agissent sur la production du biofilm. A noter que les jeunes plantes ne possèdent pas une microflore encore stabilisée par rapport aux plantes adultes. Ces mécanismes ne sont pas encore bien compris de nos jours. Lors d'une attaque par un pathogène, la

de savoir profiter des processus qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel. La souche FZB42 est connue pour sa capacité à produire un vaste spectre de métabolites bactéricides et nématocides dans la rhizosphère (Chen et al., 2007). On estime que 9% de son génome est dédié à la synthèse de métabolites antimicrobiens. C'est 4% de plus que son proche parent *B. subtilis* (Chen et al., 2009). L'effet de biocontrôle de *B. amyloliquefaciens* ne peut cependant pas être attribué directement à la synthèse de métabolites antimicrobiens car des recherches récentes ont montré qu'à l'exception de la surfactine, la quantité de ces métabolites à proximité des racines est plutôt faible. Ces métabolites peuvent, par contre, influencer la communauté bactérienne de la rhizosphère. Les lipopeptides et les composés volatiles produits par *B. amyloliquefaciens* ont un effet de biocontrôle par leur induction de résistances systémiques chez les plantes. Ceci est donc une protection indirecte des plantes contre des pathogènes. Cette stimulation de résistance par les métabolites est probablement le mécanisme principal responsable des propriétés de biocontrôle de la souche FZB42. Elle émet également des substances antifongiques telles que des lipopeptides

rempotage. Cette méthode vise à introduire la bactérie sur de jeunes plants lorsque la microflore de la rhizosphère n'est pas encore stabilisée (Berendsen et al., 2012). En effet, l'introduction de la bactérie lorsque la microflore est déjà stabilisée ne modifie pas l'environnement d'une façon observable.

Résistance systémique induite

La résistance systémique induite (RSI) est définie comme l'amélioration des capacités défensives d'une plante entière contre un large spectre de pathogènes des végétaux, acquise via une induction locale (en général racinaire) de ces défenses par un microbe bénéfique (Pieterse et al., 2014).

Comment cette RSI se met-elle en place ?

Il arrive que la présence d'un pathogène et d'une souche de bactérie bénéfique se fassent importante dans la rhizosphère. En réaction à la prolifération du pathogène (*Rhizoctonia solani* par exemple, responsable entre autres de la pourriture du collet), la souche FZB42 colonise la surface des racines. Par antibiose et concurrence nutritive, cela stoppe momentanément le développement des phytopathogènes et FZB42 se met

à sécréter diverses substances comme la surfactine, la bacillomycine D et dans une moindre mesure, de la fengycine. Ces lipopeptides cycliques, associés à la présence du pathogène, en plus de posséder eux-mêmes des propriétés antibactériennes et antifongiques, améliorent chez la plante l'expression du gène PDF 1.2 (Plant defensin factor 1.2), permettant à la plante de sécréter plus de défensine, un peptide antimicrobien.

Il est très probable que l'effet de biocontrôle de la souche FZB42 de *B. amyloliquefaciens* se fasse via cette RSI. Il s'agirait donc d'un effet indirect de FZB42 et des autres bactéries promotrices de croissance sur le microbiome racinaire y compris les phytopathogènes. Certains végétaux l'ont bien compris. Le maïs par exemple, produit des exsudats racinaires particuliers capables de stimuler la sécrétion d'acétoïne par la souche FZB42 (Kierul et al., 2015). Cette acétoïne appartient à la catégorie des composés volatils organiques (COVs) capables de déclencher cette RSI.

Quelles sont les effets de cette RSI ?

Lorsque la RSI est déclenchée chez un végétal, on observe une résistance accrue aux maladies. Par exemple dans le cas de plantules d'*Arabidopsis thaliana* exposées à la souche FB17 de *Bacillus subtilis* (une autre bactérie promotrice de croissance) on a constaté une diminution des symptômes causés par une infection de *Pseudomonas syringae* par rapport à des plants cultivés en l'absence de *B. subtilis* (Rudrappa et al., 2010).

Dans une expérience menée en 2017 par Sabaté et al., la présence de *B. amyloliquefaciens* a été liée à une absence, dans le microbiome racinaire de *Phaseolus vulgaris*, de bactéries et champignons phytopathogènes tels que *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* et *Macrophomina phaseolina* (responsable de la pourriture charbonneuse). De nombreux lipopeptides éliciteurs de RSI ont été retrouvés dans la rhizosphère : surfactine, iturine, fengycine, kurstatine et polymyxine. Ce qui laisse penser que ces effets sont dus au déclenchement de la RSI. Alors que 46% des individus témoins étaient contaminés par ces mêmes pathogènes, la présence de *B. amyloliquefaciens* a également stimulé la croissance des plants (+10% de germination, +2 cm de racines, +6 cm de tige).

Promotion de la croissance végétale

D'après Borriss et al. (2016) cité par Jha et al. (2017), la capacité de la souche FZB42 à favoriser la croissance de certaines cultures (pomme de terre, maïs, coton, tabac, légumes-fruits et feuilles, plantes ornementales) est suffisamment documentée. En revanche les effets "biofertilisants" ne sont pas complètement élucidés au niveau moléculaire. Plusieurs paramètres abiotiques ont une influence sur la croissance de la culture. D'après Böhme et al. (2016) cité par Jha et al. (2017), beaucoup de cultures comme les légumes souffrent de conditions abiotiques inadéquates, en particulier en culture hors-sol, où les interactions entre la plante et la rhizosphère sont très sensibles. Plusieurs facteurs déjà connus participent à la liaison bénéfique entre la plante et la bactérie comme la stabilisation et l'amélioration de la croissance végétale. Quelques exemples issus de la littérature scientifique récente nous apportent ces connaissances.

Une activité hormonale

Un exemple concernant la souche FZB42 d'après Borriss et al. (2016) cité par Jha et al. (2017), la croissance végétale est promue par la synthèse de l'hormone de croissance "acide acétique indole-3" (IAA, ou "auxine") par la bactérie. Fait intéressant, la plante peut influencer la production d'IAA de la bactérie en sécrétant du tryptophane dans ses exsudats racinaires. Le tryptophane est un précurseur de la biosynthèse de l'IAA qui active la transcription génique et régule positivement la production d'IAA.

L'inactivation de gènes impliqués dans cette synthèse et dans la synthèse d'IAA a résulté en une réduction à la fois de la concentration en IAA et de l'influence promotrice de la croissance sur des souches mutantes bactériennes.

Les stress abiotiques et la culture hors-sol

D'après Borriss (2016) cité par Jha et al. (2017), la culture hors-sol est principalement affectée par les perturbations abiotiques (température, pH, électroconductivité (EC)) et permet de ce fait d'avoir des conditions intéressantes pour la recherche expérimentale. Dans son étude, il évoque le cas du concombre (*Cucumis sativus* L.), plante sensible à ces conditions de culture. La souche FZB24 peut être utilisée seule et en complément avec d'autres substances stimulantes comme des acides humiques et des sels d'acides lactiques. Les acides humiques (AH) ont

un fort pouvoir tampon et permettent de réguler la salinité du support de culture. Ils possèdent aussi une capacité de transport des ions (comme le fer) et augmentent ainsi leur disponibilité immédiate. Les sels d'acide lactique peuvent chélater (liaison organo-minérale) les micronutriments et sont aptes à se lier aux ions métalliques lorsqu'ils sont appliqués dans la solution de fertirrigation. Ils réduisent les stress dus aux pH inadéquats et/ou aux températures extrêmes et agissent comme des régulateurs de fertilisation. Un produit commercial pouvant être utilisé avec cette composition de biostimulants est le LACTOFOL (voir tableau ci-dessous, donné à titre indicatif). Son application peut être réalisée au niveau de la rhizosphère (en irrigation) ou en pulvérisation sur la surface supérieure ou inférieure des feuilles. La fréquence d'application et la concentration utilisées sont des paramètres à approfondir.

Une EC trop élevée (jusqu'à 8 mS/cm), souvent en fin de culture (par accumulation de sels) est néfaste à la croissance et au rendement des cultures. L'application de FZB24 et/ou d'acides humiques potassiques (AH-K) encourage la croissance du système racinaire et peut permettre de stabiliser l'EC vers 2 mS/cm (en culture de concombre). Ces effets peuvent perdurer et indiquent dans ce cas que la bactérie est toujours présente dans le substrat.

Des valeurs de pH trop faibles ou trop basses peuvent inhiber la croissance des plantes et rendre les nutriments indisponibles dans la solution. Réguler le pH de certains substrats utilisés comme la laine de roche ou la perlite (pH > 6.5) est parfois contraignant. A savoir que le pH peut évoluer sur la durée de culture. L'application du LACTOFOL (AH-K + acides lactiques + FZB24) stimule l'enracinement et le développement des tiges même à pH élevé (7.5). Le même effet peut être obtenu avec l'application de la bactérie seule.

Sous fort stress thermique et de pH, des résultats significatifs peuvent être obtenus. Le stress est mieux supporté avec le traitement : activité photosynthétique stable, morphologie non modifiée, racines plus longues. Le retour à un état fonctionnel post-stress est plus court chez les plantes traitées.

L'évaluation finale des plantes cultivées montre que les individus ayant reçu le traitement biostimulant ont de grandes pousses et une biomasse supérieure à celle des plantes non traitées. En revanche

l'application foliaire montre un effet moins important sur la biomasse que l'application racinaire. Il semblerait que l'application foliaire ait un léger effet sur la croissance des feuilles plutôt que celle des tiges.

Les plantes traitées sur les feuilles ou sur les racines offriraient également une plus grande quantité de fruits commercialisables (jusqu'à 20% de réduction de la quantité de fruits non commercialisables avec l'application racinaire). Les AH-K élèvent la quantité de matière sèche des fruits et donc leurs qualités.

Enfin, la bactérie peut prémunir les plantes d'autres facteurs abiotiques stressant comme le froid, les radiations trop intenses ou encore la sécheresse.

La volatilité des composés organiques

D'après Beauregard (2015), l'état nutritionnel de la plante peut également influencer l'activité de *B. amyloliquefaciens* via une modification de la composition de l'exsudat racinaire. Par exemple, les exsudats de plantes privées d'azote répriment les gènes impliqués dans la chimiotaxie et la motilité (FZB42), tandis que les exsudats de maïs déficients en phosphate les régulent à la hausse (FZB45). Certaines souches sont donc utiles et d'autres non concernant les échanges nutritionnels avec les plantes.

D'après Borriss (2016) cité par Jha et al. (2017), l'exemple du phosphore est particulièrement parlant pour évoquer la participation de cette bactérie dans le prélèvement du macronutriment par la plante hôte. Ce dernier est connu pour sa faible solubilité dans la solution du sol lorsqu'il se trouve fixé à des molécules organiques (phytate). Une enzyme produite par la souche FZB45 permet d'hydrolyser ce phytate et d'en extraire le phosphore afin de le rendre soluble. Il est prouvé que sur une souche mutante dans laquelle le gène codant pour la protéine effectuant l'hydrolyse n'est pas présente, aucune stimulation de la nutrition de la plante hôte n'est observée en conditions de faible teneur en phosphore dans le milieu. De plus, des essais supplémentaires en champ démontrent que la stimulation nutritive est effective uniquement lorsque le phytate est présent et en cas de faible concentration en phosphore soluble dans le milieu.

Conclusion

A travers cette littérature scientifique récente, la découverte de cette bactérie, si lointaine soit-elle, nous paraît résolument moderne par ses caractéristiques biologiques. L'approche entre son hôte et leurs relations mutuelles sont partiellement élucidées à ce jour. Pourtant la recherche croît de manière importante. On sait maintenant quels sont les échanges plantes/microbiome rhizosphérique et les molécules, qui sont similaires à des signaux chimiques. De cette façon, la plante demande l'attention du micro-organisme quand le besoin s'en fait ressentir (lors d'une attaque, d'un manque d'éléments nutritifs ou bien encore de conditions de culture inaptes à sa bonne croissance). La bactérie intervient favorablement pour maîtriser les mauvaises situations qui l'influence elle-même et son hôte, à la manière d'un « coach ». En cultures hors-sol *B. amyloliquefaciens* permettrait de diminuer les effets de stress provenant du milieu de culture sur le végétal. La lutte microbiologique semble donc porteuse d'opportunités pour l'ensemble de la communauté agricole.

Cédric WETTA
Lucas ARMINJON
Aurélien GUIEN
Antoine CHANDELIER

Bibliographie

Beauregard, P.B. (2015). Chapter One - Not Just Sweet Talkers: How Roots Stimulate Their Colonization by Beneficial Bacteria. In *Advances in Botanical Research*, H. Bais, and J. Sherrier, eds. (Academic Press), pp. 1–20.

Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486.

Borriss, R. (2013). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Microb. Ecol. Rhizosphere* Vol. 1 2 883–898.

Borriss, R., Kierul, K., Chen, X.-H., Voigt, B., Carvalhais, L.C., Albrecht, D. (2015). Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology* 161, 131–147.

Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., et al. (2006). Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188, 4024–4036.

Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A.,

Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., et al. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* 25, 1007–1014.

Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Piel, J., Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* 140, 27–37.

Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Front. Microbiol.* 6.

Gerbore, J., Brutel, A., Lemainque, A., Mairey, B., Médigue, C., Vallenet, D., Lefort, F., Grizard, D. (2016). Complete Genome Sequence of *Bacillus methylophilus* Strain B25, a Potential Plant Growth-Promoting Rhizobacterium. *Genome Announc.* 4, e00058-16.

Jha, D.C., Islam, T., Rahman, M., Pandey, P., Aeron, A. (2017). *Bacilli and Agrobiotechnology*.

Kierul, K., Voigt, B., Albrecht, D., Chen, X.-H., Carvalhais, L.C., Borriss, R. (2015). Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology* 161, 131–147.

Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186, 1084–1096.

OFAG (2018). Office fédéral de l'agriculture OFAG – Index des produits phytosanitaires.

Ongena, M. (2014). Biopesticides : une protection plus naturelle pour les cultures.

Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Czymbek, K.J., Paré, P.W., Bais, H.P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Commun. Integr. Biol.* 3, 130–138.

Scholz, R., Molohou, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Süßmuth, R.D., Mitchell, D.A., Borriss, R. (2011). Plantazolicin, a Novel Microcin B17/Streptolysin S-Like Natural Product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 193, 215–224.

Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K., Schwecke, T., Herfort, S., Lasch, P., Borriss, R. (2014). Amylocyclicin, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 196, 1842–1852.

Zhang, N., Yang, D., Kendall, J.R.A., Borriss, R., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Shen, Q., Zhang, R. (2016). Comparative Genomic Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* Reveals Evolutional Traits for Adaptation to Plant-Associated Habitats. *Front. Microbiol.* 7, 2039.

Erwinia amylovora, la bactérie qui met le feu aux cultures !

Le feu bactérien s'est imposé comme une problématique majeure dans les cultures des Rosacées. De nombreuses mesures sont mises en place afin de contrôler cette bactérie et limiter son impact sur les cultures. La recherche s'oriente maintenant vers la lutte microbiologique et le développement de variétés résistantes afin de faire face à une maladie touchant de nombreuses régions du monde.

Introduction

En agriculture, les pathogènes représentent une cause importante de dégâts et de pertes et suscitent des mesures de contrôle importantes. *Erwinia amylovora* est une bactérie importante, responsable de la maladie du feu bactérien sur les Rosacées (notamment les pommiers, les poiriers ou encore les cotonniers) que redoutent grandement les arboriculteurs. Protéobactérie¹ de type gram négatif, elle est originaire d'Amérique du nord, où elle fut découverte vers la fin du 18^{ème} siècle dans la vallée de l'Hudson, dans la région de New York. Importée en Europe au milieu du 20^{ème} siècle, elle est aujourd'hui présente en Europe, en Amérique du nord, en Afrique du nord, en Nouvelle Zélande et en Asie de l'ouest.



Une dissémination importante, une infection rapide

Sa dispersion sur de courtes distances est due à la capacité de la bactérie à produire un exsudat qui facilite son transport par le vent, la pluie ou les insectes sur de plus longues distances. Le transport de matériel végétal contaminé reste cependant le principal vecteur de sa dissémination à l'échelle mondiale. Afin de contrôler sa propagation, une

¹ Groupe de bactéries regroupant des pathogènes tels

à la surface des stigmates avant l'apparition des symptômes (similaires pour toutes les plantes hôtes). L'infection des feuilles et fruits se fait par le biais des pétioles, des tiges ou de blessures causées par la grêle, le vent et les insectes. Un brunissement des tissus infectés correspondant à une nécrose (pousses, greffes, écorce, etc.) est alors observé puis, les feuilles et fruits finissent par tomber. Lorsque le climat est humide, des gouttelettes d'exsudat (oozes) apparaissent à la surface des tissus infectés.

Plus de 100 hectares de vergers détruits sur Vaud en 2007 selon la station fédérale de recherche de Changins (VD).

à la surface des stigmates avant l'apparition des symptômes (similaires pour toutes les plantes hôtes). L'infection des feuilles et fruits se fait par le biais des pétioles, des tiges ou de blessures causées par la grêle, le vent et les insectes. Un brunissement des tissus infectés correspondant à une nécrose (pousses, greffes, écorce, etc.) est alors observé puis, les feuilles et fruits finissent par tomber. Lorsque le climat est humide, des gouttelettes d'exsudat (oozes) apparaissent à la surface des tissus infectés.

Une maladie dévastatrice

Les dégâts engendrés par la bactérie peuvent alors avoir d'importants impacts économiques (4.7 millions de dollars de pertes sur les poires en 1976, 600 hectares de vergers perdus en Allemagne en 1996, 100 hectares de vergers détruits dans le canton de Vaud en 2007 selon la station fédérale de recherche de Changins VD).

Pour faire face à cette menace, l'Union Européenne a mis en place plusieurs politiques de protection comme la mise en quarantaine des foyers d'infections et du matériel végétal de commercialisation ainsi que le contrôle des



Figure 1: aire de répartition mondiale du Feu bactérien. Source : <https://www.cabi.org>

cargaisons de végétaux susceptibles d'être contaminés et enfin, la création de zones protégées où l'importation de plantes hôtes de la bactérie est interdite. Cependant, les cultivars commerciaux sont très sensibles à la bactérie. Un contrôle régulier des cultures est donc particulièrement important au printemps en particulier 3 à 5 semaines après la floraison, avant l'activation du chancre bactérien et pendant l'été, en cas de vents importants. Le contrôle est aussi important après l'élongation des pousses afin d'enlever les parties infectées du végétal.

Les différentes méthodes de lutte

Figure 2 et 3 : symptômes et apparition d'oozes sur fruits. Sources : (Lespinasse and Aldwinckle, 2000)

De nos jours, quatre catégories de produits chimiques sont utilisées contre *Erwinia amylovora* : les antibiotiques, les régulateurs de croissance,

les produits contenant du cuivre et les éliciteurs³.

En Suisse, la bactérie a fait son apparition en 1989 sur du Cotoneaster et en 1991 sur des poiriers et pommiers. Malgré une mise en quarantaine, la bactérie s'est propagée dans le pays jusqu'à atteindre un pic d'infestation en 2007 qui a abouti à l'arrachage des arbres contaminés. Pour limiter la propagation, l'OFAG a exceptionnellement autorisé en 2008, l'utilisation de streptomycine (antibiotique perturbateur de la synthèse protéique).

Dans les vergers suisses, les principaux produits utilisés pour lutter contre le pathogène sont le Blossom Protect (produit de lutte microbiologique contenant le champignon Aureobasidium pullulans) qui peut être associé au Myco-Sin (produit de lutte microbiologique à base de sulfate d'aluminium) pour une meilleure efficacité, le LMA (produit à base de sulfate d'aluminium et de potassium) ou encore, certains produits à base de cuivre comme l'hydroxyde de cuivre pouvant poser des problèmes d'accumulation dans les eaux et le sol. Ces produits sont une bonne alternative de lutte mais présentent une efficacité modérée (entre 70% et 80%)⁴. Le développement de cultivars résistants s'impose également comme solution majeure dans cette lutte avec un taux de pousses infectées moindre. Les cultivars peuvent être



sélectionnés de façon conventionnelle comme la Ladina (-75% de pousses infectées par rapport à la variété Gala Galaxy (Commission

³ Molécule produite par un pathogène, activant chez la plante des mécanismes de défense.

⁴ Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique CFSB, 2015

fédérale d'experts pour la sécurité biologique CFSB 2015)) ou par génie génétique. Cette dernière méthode consiste à croiser une variété cultivée comme la Gala (sensible à la bactérie) avec un pommier sauvage résistant (sans intérêts agronomiques) afin d'aboutir à un cultivar ayant une forte immunité vis-à-vis de la bactérie. L'efficacité des cultivars résistants développés par génie génétique montre une efficacité élevée toutefois, le moratoire sur les OGM ne permet pas la vente de tels produits en Suisse.

Lutte microbiologique contre Erwinia amylovora :

Dans une optique plus respectueuse des écosystèmes, de nombreuses

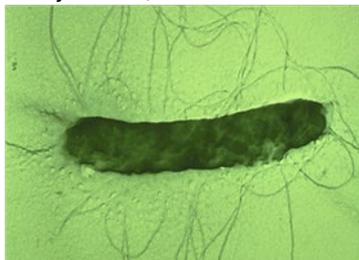


Figure 4 : Photo du pathogène Erwinia amylovora. Source : www.apsnet.org

recherches sont centrées sur des méthodes de lutte n'utilisant pas ou peu d'intrants chimiques. La lutte microbiologique, en utilisant les caractéristiques d'espèces microbiennes antagonistes, tente de trouver des alternatives efficaces et rentables aux traitements dits conventionnels.

Le feu bactérien étant un enjeu économique important, de nombreuses recherches en lutte microbiologique sont menées depuis ces dernières années. De plus, à l'instar de l'Amérique du Nord, les différentes méthodes de luttés contre Erwinia amylovora en Europe sont peu nombreuses. En effet, les législations européennes et suisses interdisent tout traitement par antibiotiques dans les cultures afin d'éviter l'apparition de résistances chez le pathogène. Deux principales méthodes utilisant des microorganismes sont donc étudiées à savoir l'utilisation de bactéries et de

virus pour lutter contre Erwinia amylovora.

Les bactéries :

Les bactéries, organismes procaryotes, ont acquis au cours de leur évolution la capacité de produire des métabolites secondaires⁵. Certains d'entre eux intéressent particulièrement la lutte microbiologique pour leurs effets antagonistes contre des pathogènes.

- Les antibiotiques : certaines bactéries et champignons produisent naturellement des substances lorsqu'ils sont en concurrence avec d'autres bactéries pour le même biotope.
- Les sidérophores : ce sont des molécules capables de former un complexe avec des ions de Fe^{3+} . Le fer étant essentiel au métabolisme des êtres-vivants, certaines bactéries, sont capables de synthétiser ces sidérophores afin de capter le plus de ions ferriques dans le milieu nutritif.
- Certaines bactéries sont aussi capables de synthétiser de l'acide cyanhydrique (HCN) pour limiter la concurrence d'autres micro-organismes.

Utilisation de bactéries des genres Pseudomonas, Pantoea et Bacillus dans la lutte contre le feu bactérien :

Certaines espèces du genre Pseudomonas, peuvent synthétiser ces métabolites secondaires, notamment Pseudomonas fluorescens (Jacques et al. 1993). Ces bactéries non-pathogènes, présentes au niveau du sol et de la rhizosphère peuvent avoir

⁵ Substances chimiques non essentielles à la vie, synthétisées par certains organismes telles que les bactéries ou encore les plantes.

un impact majeur contre certains pathogènes du sol et des plantes dont *Erwinia amylovora*.

Le premier produit BlightBan A506, composé de la souche A506 de *Pseudomonas fluorescens*, a été homologué et autorisé à la vente en 1996. Il permet de diminuer de 50 à 80% l'incidence d'*E. amylovora* sur les cultures (Stockwell et al. 2010). À l'heure actuelle, les interactions entre les bactéries du genre *Pseudomonas* et les bactéries du genre *Erwinia* tendent à être mieux comprises. *Pseudomonas fluorescens* a la capacité de synthétiser des sidérophores ainsi que des antibiotiques (Cabrefiga, Bonaterra, et Montesinos 2007) ce qui empêche le pathogène de coloniser les zones à risques en limitant l'accès aux nutriments et à la rhizosphère (Stockwell et al. 2010).

Une autre bactérie du genre *Pseudomonas* se trouvant dans le sol et dans la phyllosphère des pommiers est *Pseudomonas graminis* (Mikiciński et al. 2016). Les recherches actuelles semblent démontrer que la souche 49M de cette bactérie a la capacité de réduire plus fortement l'incidence du feu bactérien (A. Mikiciński et al. 2011). Son

synthétisation d'antibiotiques (Pusey et al. 2011). De plus, *Pantoea agglomerans* aurait la capacité de réduire le pH autour des stigmates, voie d'entrée du pathogène, ce qui pourrait en empêcher la colonisation par le pathogène (Pusey et al. 2011). Toutefois, cette espèce peut cependant être aussi un pathogène opportuniste de certains mammifères dont l'être humain (Broggini et al. 2005). L'Union Européenne en a donc restreint son utilisation en tant que biopesticide.

Le genre *Bacillus* présente l'avantage de compter déjà plusieurs espèces présumées inoffensives⁶ par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Bonaterra et al. 2014), ce qui représente un atout considérable dans la recherche et pour l'homologation de produits. *Bacillus subtilis* est une de ces espèces approuvées par l'Union Européenne et possède un fort pouvoir de répression contre *Erwinia amylovora*. Elle peut inhiber la croissance du pathogène par compétition sur le stigma des fleurs (Schoofs et al. 2015), ou encore en synthétisant de nombreuses molécules inhibitrices, notamment des peptides antimicrobiens (Schoofs et al.

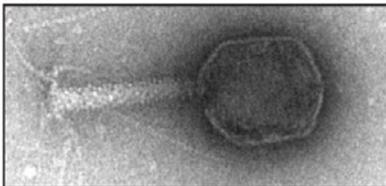
Utilisation des virus contre *Erwinia amylovora*

Les bactériophages sont des virus spécialisés dans l'infection des bactéries. Très présents dans le sol, ils représentent un outil de lutte intéressant : leur mode de prédation provoque la lyse de la bactérie qui relâche alors d'autres virus qui iront infecter les autres bactéries très rapidement. En lutte microbiologique, les familles Myoviridae, Podoviridae et Siphoviridae (Schwarczinger et al. 2017) sont déjà utilisées contre certains pathogènes et des produits à base de phages tel que Erwiphage sont déjà en vente en Hongrie (Lagonenko et al. 2015). Toutefois, la probabilité que les bactéries acquièrent des résistances contre ces virus est très forte, l'utilisation de ce type de biocide ne peut donc pas se faire régulièrement, gros désavantage dans la lutte contre le feu bactérien (Schwarczinger et al. 2017).

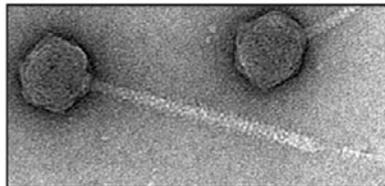
Conclusion

Afin de pallier au danger du feu bactérien, les mesures de contrôle et les méthodes de lutte mises en place sont donc très importantes mais ne sont pas suffisamment efficaces pour éradiquer la bactérie. En

Myoviridae



Siphoviridae



Podoviridae

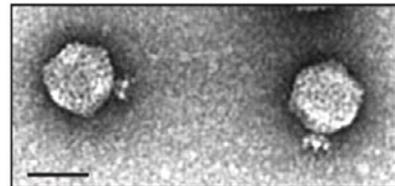


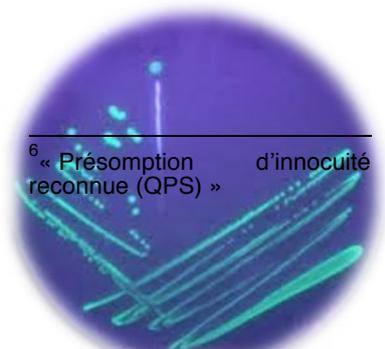
Figure 7 : Photo des bactériophages (taille : 50 nm). Source : <http://mibr.asm.org>

efficacité et surtout sa présence beaucoup plus marquée dans la phyllosphère font d'elle une bactérie très intéressante.

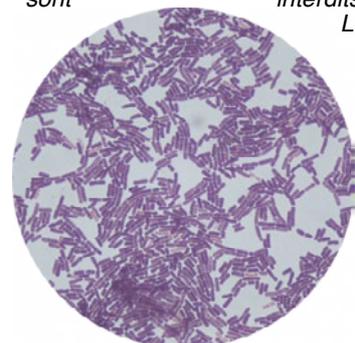
Le genre *Pantoea* contient aussi des bactéries utilisables en lutte microbiologique. Par exemple, *P. agglomerans* et *P. vagans* sont deux bactéries qui ont un effet antagoniste contre *E. amylovora*. Des bactéricides contenant ces souches sont déjà autorisés en Amérique du Nord et en Nouvelle-Zélande (Pusey et al. 2011). Comme pour le genre *Pseudomonas*, ces bactéries inhibent la croissance du pathogène par compétition ou par

2015), très efficaces contre *E. amylovora*. Déjà utilisés contre d'autres maladies bactériennes ou fongiques, des produits à base de *B. subtilis* sont déjà en vente notamment Serenade® Max, produit par Bayer.

Amérique du nord, l'utilisation d'antibiotiques est autorisée mais la problématique de résistance d'*Erwinia amylovora* est réelle. Quant à l'Europe et plus précisément en Suisse, pour éviter ce risque de résistances, les antibiotiques sont interdits. Le



⁶ « Présomption d'innocuité reconnue (QPS) »



choix de méthodes de lutte est donc moindre et destiné principalement à limiter la propagation et l'impact de la bactérie sur les cultures. L'utilisation de microorganismes pour contrer cette bactérie est donc une méthode de lutte ayant un grand potentiel. Les recherches

actuelles permettent une meilleure compréhension de l'interaction entre le pathogène et les bactéries antagonistes ou encore les bactériophages. Les résultats en laboratoire semblent donc prometteurs et peuvent fournir un outil de lutte contre E. amylovora efficace.

Ibrahim Ryan

Marchon Laurent

Outdili Hajar

Schmid Matthias

Bibliographie

- Bonaterra, A., J. Cabrefiga, I. Mora, G. Roselló, J. Francés, et E. Montesinos. Anglais, 2014. « GRAM-POSITIVE BACTERIA PRODUCING ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS EFFICIENT BIOCONTROL AGENTS OF FIRE BLIGHT ». *Acta Horticulturae*, n° 1056 (octobre): 117-22. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1056.16>.
- Borruso, Luigimaria, Marco Salomone-Stagni, Ivan Polsinelli, Armin Otto Schmitt, et Stefano Benini. Anglais, 2017. « Conservation of *Erwinia Amylovora* Pathogenicity-Relevant Genes among *Erwinia* Genomes ». *Archives of Microbiology* 199 (10): 1335-44. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1409-7>.
- Broggini, G. a. L., B. Duffy, E. Holliger, H.-J. Schärer, C. Gessler, et A. Patocchi. Anglais, 2005. « Detection of the Fire Blight Biocontrol Agent <Emphasis Type="Italic">*Bacillus Subtilis*</Emphasis> BD170 (Biopro<Superscript>®</Superscript>) in a Swiss Apple Orchard ». *European Journal of Plant Pathology* 111 (2): 93-100. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-1423-x>.
- Cabrefiga, Jordi, Anna Bonaterra, et Emilio Montesinos. Anglais, 2007a. « Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight ». *International microbiology* 10 (2): 123.
- . Anglais, 2007b. « Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight ». *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 10 (juillet): 123-32. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.18>.
- Comission fédérale d'experts pour la sécurité biologique CFSB. 2015. « Comparaison des différentes méthodes de lutte contre le feu bactérien en Suisse en termes de biosécurité, d'efficacité et de durabilité ». 2015. http://www.efbs.admin.ch/fileadmin/efbs-dateien/dokumentation/Publikationen/15_Vergleichsstudie_Feuerbrand_Kurzversion_F.pdf.
- Crovadore, Julien, Gautier Calmin, Romain Chablais, Bastien Cochard, Torsten Schulz, et François Lefort. Anglais, 2016. « Whole-Genome Sequence of *Pseudomonas Graminis* Strain UASWS1507, a Potential Biological Control Agent and Biofertilizer Isolated in Switzerland ». *Genome Announcements* 4 (5): e01096-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01096-16>.
- Duffy, Brion, Hans-Jakob Schaerer, Markus Bünter, A Klay, et Edward Holliger. Anglais, 2005. « Regulatory measures against *Erwinia amylovora* in Switzerland* ». *EPPÖ Bulletin* 35 (août): 239-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00820.x>.
- « Fongicides Serenade® Max: Bayer-Agri, traitement phytopharmaceutique pour la protection des cultures - Serenade® Max ». s. d. Consulté le 24 janvier 2018. <https://www.bayer-agri.fr/produits/fiche/serenade-max/>.
- Gusberti, Michele, Urs Klemm, Matthias S. Meier, Monika Maurhofer, et Isabel Hunger-Glaser. Anglais, 2015. « Fire Blight Control: The Struggle Goes On. A Comparison of Different Fire Blight Control Methods in Switzerland with Respect to Biosafety, Efficacy and Durability ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12 (9): 11422-47. <https://doi.org/10.3390/ijerph120911422>.
- Jacques, Philippe, Philippe Delfosse, Marc Ongena, Philippe Lepoivre, Pierre Cornélis, Nico Koedam, Louis Neirinckx, et Philippe Thonart. 1993. « Les mécanismes biochimiques développés par les "Pseudomonas" fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol ». *Cahiers Agricultures* 2 (5): 301-307 (1).
- Jourdheuil, Pierre, Pierre Grison, et Alain Fraval. 1991. « La lutte biologique: un aperçu historique ». *COURRIER DE LA CELLULE ENVIRONNEMENT INRA* 15 (15): 37-60.
- Lagonenko, Alexander L., Olga Sadovskaya, Leonid N. Valentovich, et Anatoly N. Evtushenkov. Anglais, 2015. « Characterization of a New *Vil*-like *Erwinia Amylovora* Bacteriophage PhiEa2809 ». *FEMS Microbiology Letters* 362 (7). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv031>.
- Lateur, M. 2002. « Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 6 (2): 67-77.
- Mikicinski, A., P. Sobiczewski, A. Jakubowska, J. Pulawska, et S. Berczynski. Anglais, 2011. « *Pseudomonas Graminis* as a Biocontrol Agent of Fire Blight ». In *Xii International Workshop on Fire Blight*, édité par P. Sobiczewski, M. Kaluzna, et J. Pulawska, 896:471-76. Leuven 1: Int Soc Horticultural Science.
- Mikiciński, A., P. Sobiczewski, A. Jakubowska, J. Pulawska, et S. Berczyński. Anglais, 2011. « PSEUDOMONAS GRAMINIS AS A BIOCONTROL AGENT OF FIRE BLIGHT ». *Acta Horticulturae*, n° 896 (mai): 471-76. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.896.69>.
- Mikiciński, Artur, Piotr Sobiczewski, Joanna Puławska, et Robert Maciorowski. Anglais, 2016. « Control of Fire Blight (<Emphasis Type="Italic">*Erwinia Amylovora*</Emphasis>) by a Novel Strain 49M of <Emphasis Type="Italic">*Pseudomonas Graminis*</Emphasis> from the Phyllosphere of Apple (<Emphasis Type="Italic">*Malus*</Emphasis> Spp.) ». *European Journal of Plant Pathology* 145 (2): 265-76. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0837-y>.
- Mikiciński, Artur, Piotr Sobiczewski, Joanna Puławska, et Eligio Malusa. Anglais, 2016a. « Antagonistic potential of *Pseudomonasgraminis* 49M against *Erwiniaamylovora*, the causal agent of fire blight ». *Archives of Microbiology* 198: 531-39. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1207-7>.
- . Anglais, 2016b. « Antagonistic potential of *Pseudomonasgraminis* 49M against *Erwiniaamylovora*, the causal agent of fire blight ». *Archives of Microbiology* 198: 531-39. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1207-7>.
- Pusey, P. L., V. O. Stockwell, C. L. Reardon, T. H. M. Smits, et B. Duffy. Anglais, 2011. « Antibiosis Activity of *Pantoea Agglomerans* Biocontrol Strain E325 against *Erwinia Amylovora* on Apple Flower Stigmas ». *Phytopathology* 101 (10): 1234-41. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0253>.
- Pusey, P. L., V. O. Stockwell, et D. R. Rudell. Anglais, 2008. « Antibiosis and Acidification by *Pantoea Agglomerans* Strain E325 May Contribute to Suppression of *Erwinia Amylovora* ». *Phytopathology* 98 (10): 1136-43. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-10-1136>.
- Schaub, Lukas, Olivier Cazelles, et Eduard Holliger. 2003. « Feu bactérien ». *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture* 35 (1): 65-68.
- Schoofs, H., W. Verjans, T. Deckers, L. De Maeyer, et D. Bylemans. Anglais, 2015. « THE USE OF THE BACTERIAL ANTAGONIST *BACILLUS SUBTILIS* AND THE PLANT DEFENSE ENHANCER FOSETYL-AL AGAINST FIRE BLIGHT ON PEAR ». *Acta Horticulturae*, n° 1094 (septembre): 485-92. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1094.65>.

-
- Schwarczinger, I., J. Kolozsváriné Nagy, A. Künstler, L. Szabó, K. Geider, L. Király, et M. Pogány. 2017a. « Characterization of Myoviridae and Podoviridae Family Bacteriophages of *Erwinia amylovora* from Hungary - Potential of Application in Biological Control of Fire Blight ». *European Journal of Plant Pathology* 149 (3): 639-52. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1214-9>.
- Sharifazizi, Mohamad, Behrouz Harighi, et Amin Sadeghi. Anglais, 2017. « Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria ». *Biological Control* 104 (Supplement C): 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.007>.
- Stockwell, Virginia, K B Johnson, D Sugar, et Joyce Loper. Anglais, 2010. « Control of Fire Blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 Applied as Single Strains and Mixed Inocula ». *Phytopathology* 100 (décembre): 1330-39. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0097>.
- Wilson, M., et S.E. Lindow. Anglais, 1993. « INTERACTIONS BETWEEN THE BIOLOGICAL CONTROL AGENT *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* A506 AND *ERWINIA AMYLOVORA* IN PEAR BLOSSOMS ». *Acta Horticulturae*, n° 338 (août): 329-30. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.338.51>.