

## **Amélioration du protocole d'analyse bioinformatique et identification par séquençage haut débit et analyse bioinformatique d'agents antagonistes de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp en aquaponie**

**Auteur :** Depireux, Pierre

**Promoteur(s) :** Massart, Sébastien; Jijakli, Haissam

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2018-2019

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/8189>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**AMÉLIORATION DU PROTOCOLE D'ANALYSE  
BIOINFORMATIQUE ET IDENTIFICATION PAR  
SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT ET ANALYSE  
BIOINFORMATIQUE PAR SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT  
ET ANALYSE BIOINFORMATIQUE D'AGENTS  
ANTAGONISTES DE PYTHIUM APHANIDERMATUM  
(EDSON) FITZP EN AQUAPONIE**

**DEPIREUX PIERRE**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2018-2019**

**CO-PROMOTEURS : MASSART S. ET JIJAKLI H.**

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique<sup>1</sup> de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

---

<sup>1</sup> Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT

**AMÉLIORATION DU PROTOCOLE D'ANALYSE  
BIOINFORMATIQUE ET IDENTIFICATION PAR  
SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT ET ANALYSE  
BIOINFORMATIQUE PAR SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT ET  
ANALYSE BIOINFORMATIQUE D'AGENTS  
ANTAGONISTES DE PYTHIUM APHANIDERMATUM  
(EDSON) FITZP EN AQUAPONIE**

**DEPIREUX PIERRE**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2018-2019**

**CO-PROMOTEURS : MASSART S. ET JIJAKLI H.**

## Abstract

Aquaponic is a soilless culture system combining aquaculture and hydroponics. However, those systems still lack in means to fight against pathogens because fish's presence hinder the use of chemical products. Those systems are vulnerable to plant pathogens that can easily spread in water, *Pythium aphanidermatum* being one of the major threats in soilless systems. Then, ways of fighting pathogens bypassing chemical treatments are needed like the use of biocontrol agents. Moreover, a suppressive effect of aquaponic water has been observed on the mycelium's growth of this phytopathogen. This study takes place in the problematic to identify organism in aquaponics that are not present in hydroponics and in complemented aquaponics. This could explain the suppressive effect and to develop efficient biological control agents against this pathogen. Then, lettuce rhizoplane, rhizosphere and endosphere has been sampled in an in vivo experience including the inoculation of *P. aphanidermatum*. Samples' DNA has been extracted and bacterial and fungal communities has been amplified by PCR by targeting V1-V3 region of rRNA 16S and ITS1 respectively. Illumina Miseq technology has been used for high throughput sequencing. Sequences has been analysed with QIIME 1.9.1 software. Results showed high differentiation in microbiota of rhizoplane and rhizosphere that highlight organisms that could have antagonist activities: *Sphingobium*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Azospirillum*, *Bdellovibrio*, *Haliangiaceae*, *Rhodococcus*, *Lysobacter* and *Pseudomonas* for bacterial communities and *Catenaria*, *Pseudozyma* and *Penicillium* for fungal communities

**Keywords:** Suppression, aquaponics, HTS, bacteria communities, fungi communities, *Pythium aphanidermatum*

## Résumé

L'aquaponie est un système de culture hors-sol combinant l'aquaculture et l'hydroponie. Cependant, ces systèmes manquent encore de moyens de lutte contre les pathogènes car la présence de poissons empêche un traitement avec des produits chimiques. Ces systèmes étant vulnérables aux agents pathogènes pouvant se propager dans l'eau, *Pythium aphanidermatum* constitue ainsi une menace importante pour ces systèmes. Dès lors, des moyens de lutte contournant les produits chimiques sont recherchés comme le recours à des agents de biocontrôles. De plus, un effet suppressif de l'eau aquaponique a été observé sur la croissance de cet agent phytopathogène. Cette étude se place donc dans cette problématique en cherchant à identifier des organismes présents dans cette eau aquaponique mais pas dans les eaux hydroponiques et aquaponiques complémentées. Cela permettrait d'expliquer cet effet suppressif et de pouvoir développer des agents de contrôle biologique efficaces contre ce pathogène. Dès lors, des échantillons de rhizoplane, rhizosphère et endosphère d'une expérience *in vivo* impliquant l'inoculation de *P. aphanidermatum* ont été récoltés. L'ADN de ces échantillons a ensuite été extrait, et les communautés bactériennes et fongiques ont été amplifiées par PCR en visant les régions V1-V3 de l'ARNr 16S et de l'ITS1 respectivement. Un séquençage haut-débit Illumina MiSeq a ensuite été réalisé. L'analyse des séquences en résultant a été réalisée grâce au logiciel QIIME 1.9.1. Les résultats montrent une forte différenciation au niveau des microbiotes de la rhizoplane et de la rhizosphère qui a permis de mettre en évidence des organismes qui pourraient avoir un effet antagoniste : *Sphingobium*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Azospirillum*, *Bdellovibrio*, *Haliangiaceae*, *Rhodococcus*, *Lysobacter* et *Pseudomonas* pour les communautés bactériennes et *Catenaria*, *Pseudozyma* et *Penicillium* pour les communautés fongiques.

**Mots-clés :** Suppression, aquaponie, HTS, communautés bactériennes, communautés fongiques, *Pythium aphanidermatum*

# TABLE DES MATIERES

<b>I. Contexte général</b>	<b>1</b>
<b>II. Introduction</b>	<b>2</b>
1. Aquaponie	2
1.1. Introduction et définitions	2
1.2. Aquaponie couplée et découplée	5
2. Interactions plante-microorganismes	6
3. Maladies dans les systèmes de culture hors-sol	9
3.1. Cycle épidémiologique	10
3.2. Sources d'inoculum	12
3.3. Agents pathogènes dans les systèmes de culture hors-sol	13
4. Lutte contre les agents pathogènes	14
4.1. Désinfection physique	14
4.1. Désinfection chimique	18
4.2. Contrôle biologique	19
5. Effet suppressif contre <i>Pythium aphanidermatum</i> en aquaponie	22
6. Séquençage haut-débit et caractérisation de communautés microbiennes	23
6.1. Régions étudiées	24
6.2. Analyse bioinformatique	25
6.3. Etude de la diversité	27
<b>III. Contexte et objectifs</b>	<b>28</b>
<b>IV. Matériel et méthode</b>	<b>29</b>
1. Manipulations en laboratoire	29
1.1. Récolte et conservation du microbiote racinaire des laitues	29
1.2. Récupération des différents microbiotes racinaires	30
1.3. Cultures pures de <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	30
1.4. Extraction de l'ADN	31
1.5. Amplification PCR	31
1.6. Séquençage haut-débit	32
2. Analyse bioinformatique	33
2.1. Plan de travail	33
<b>V. Résultats</b>	<b>39</b>
1. Evaluation des méthodes d'assignation taxonomique	39

2.	Ajout du <i>read forward</i> .....	40
3.	Culture pure de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> .....	44
4.	Evaluation des différences entre les deux expérimentations <i>in vivo</i> .....	45
4.1.	Rhizoplane .....	46
4.2.	Endosphère.....	47
4.3.	Rhizosphère.....	49
5.	Etude de l'essai <i>in vivo</i> 1 .....	50
5.1.	Rhizoplane .....	50
5.2.	Endosphère.....	56
5.3.	Rhizosphère.....	60
6.	Etude de l'essai <i>in vivo</i> 2 .....	64
<b>VI.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>65</b>
1.	Evaluation des méthodes d'assignation taxonomique.....	65
2.	Ajout du <i>read</i> 1 .....	65
3.	Culture pure de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> .....	66
4.	Evaluation des différences entre les deux expérimentations <i>in vivo</i> .....	67
5.	Etude de l'essai <i>in vivo</i> 1 .....	67
5.1.	Communautés bactériennes .....	67
5.2.	Communautés fongiques.....	70
<b>VII.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>71</b>
1.	Amélioration du plan de travail d'analyse bioinformatique.....	71
2.	Analyse des essais <i>in vivo</i> .....	71
3.	Perspectives .....	72
<b>VIII.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>73</b>



## Liste des figures

Figure 1: Cycle de l'azote en aquaponie, relation symbiotique entre poissons, plantes et bactéries (Goddek <i>et al.</i> , 2015).....	4
Figure 2 : Disponibilité en minéraux dans une solution nutritive hydroponique (Trejo-Téllez and Gómez-Merino, 2012). .....	5
Figure 3: Etapes de base du cycle épidémiologique (Stouvenakers <i>et al.</i> , 2019) .....	11
Figure 4: Carte de gènes de d'ARN ribosomiques et de leurs régions ITS. Les amorces <i>forward</i> (flèche vers la droite) et <i>reverse</i> (flèche vers la gauche) permettant l'amplification de ces régions sont représentées (Toju <i>et al.</i> , 2012). .....	25
Figure 5 : Photos d'une des deux expériences <i>in vivo</i> réalisée par Gilles Stouvenakers. (Photos : Gilles Stouvenakers) .....	29
Figure 6: Plan de travail de l'analyse bioinformatique à partir de fichiers en format FASTQ réalisée sous QIIME 1.9.1 .....	34
Figure 7 : Représentation de la répartition taxonomique assignée observée suite à l'analyse sur QIIME et de la répartition taxonomique attendue dans la <i>mock community</i> .....	40
Figure 8 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne des communautés bactériennes dans les échantillons de rhizoplane selon l'ajout du read 1 après l'étape de d'appariement des reads 1 et 2. ....	42
Figure 9 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne des communautés fongiques dans les échantillons de rhizoplane selon l'ajout du read 1 après l'étape d'appariement des reads 1 et 2. ....	43
Figure 10 : Représentation de la répartition taxonomique de la population bactérienne des cultures pures de <i>P. chlororaphis</i> .....	44
Figure 11 : Représentation de la répartition taxonomique de la population bactérienne des cultures pures de <i>P. chlororaphis</i> après blast des 10 séquences majoritaires non assignées lors de l'analyse bioinformatique sur QIIME. ....	45
Figure 12 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de la rhizoplane. Rouge : Essai <i>in vivo</i> 1 ; Bleu : Essai <i>in vivo</i> 2	46
Figure 13 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de la rhizoplane des essais <i>in vivo</i> 1 et 2. ....	47
Figure 14 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communauté bactériennes d'endosphère. Rouge : Essai <i>in vivo</i> 1 ; Bleu : Essai <i>in vivo</i> 2.....	48
Figure 15 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes d'endosphère des essais <i>in vivo</i> 1 et 2. ....	48
Figure 16 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de rhizosphère. Rouge : Essai <i>in vivo</i> 1 ; Bleu : Essai <i>in vivo</i> 2 ..	49
Figure 17 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de rhizosphère des essais <i>in vivo</i> 1 et 2. ....	49
Figure 18 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population microbienne de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> . Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique.....	50

Figure 19 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.....	51
Figure 20 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P. aphanidermatum</i> .	51
Figure 21 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population fongique de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P. aphanidermatum</i> .	54
Figure 22 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de rhizoplane. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.....	54
Figure 23 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés fongiques de rhizoplane selon le type d'eau du bac de culture et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> .	55
Figure 24 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population bactérienne de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> . Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique.....	56
Figure 25 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de l'endosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.....	57
Figure 26 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> . .....	57
Figure 27 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population fongique de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> . Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique. ....	58
Figure 28 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de l'endosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.....	59
Figure 29 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés fongiques de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> ...	59
Figure 30 : Représentation de la répartition taxonomique de la population bactérienne de la rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> . Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique. ....	60
Figure 31 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de l'endosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.....	61
Figure 32 : Représentation de la répartition taxonomique de la population fongique de la rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P. aphanidermatum</i> ....	63
Figure 33 : Analyse en coordonnées principales de la $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de la rhizosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.....	63

## Liste des tables

Tableau 1 : Comparaison du nombre de séquences selon le type de microbiote et l'ajout ou non des reads 1 après l'étape d'appariement des reads 1 et 2. * : différence significative, ** : différence hautement significative, *** : différence très hautement significative.....	41
Tableau 2 : Comparaison des indices d' $\alpha$ -diversité chao1, OTUs observés et Shannon selon l'ajout du <i>read</i> 1 après l'étape de fusion des <i>reads</i> 1 et 2. * : différence significative, ** : différence hautement significative, *** : différence très hautement significative.....	43
Tableau 3 : Tableau des indices de diversité $\alpha$ (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon et PD whole tree) des échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P. aphanidermatum</i> ..	52
Tableau 4 : Liste des taxons de bactéries identifiés comme présentant des abondances relatives significativement plus élevées en AP qu'en AP+ et HP ou en APPA qu'en AP+PA et HPPA.	52
Tableau 5 : Tableau des indices de diversité $\alpha$ (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon) des échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> .....	55
Tableau 6 : Tableau des indices de diversité $\alpha$ (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon, PD Whole tree) des échantillons de communautés bactériennes de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> .	58
Tableau 7 : Tableau des indices de diversité $\alpha$ (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon) des échantillons de communautés fongiques d'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatu</i>	60
Tableau 8 : Tableau des indices de diversité $\alpha$ (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon, PD Whole tree) des échantillons de communautés bactériennes de rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> .	61
Tableau 9 : Liste des taxons de bactéries identifiés comme présentant des abondances relatives plus élevées en AP qu'en AP+ et HP ou en APPA qu'en AP+PA et HPPA.	62
Tableau 10 : Tableau des indices de diversité $\alpha$ (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon) des échantillons de communautés bactériennes de la rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène <i>P.aphanidermatum</i> .	64
Tableau 11 : Liste des taxons de champignons identifiés comme présentant des abondances relatives plus élevées en AP qu'en AP+ et HP ou en APPA qu'en AP+PA et HPPA.....	64

## Liste des abréviations

AP : Aquaponie

AP+ : Aquaponie complémentée

HP : Hydroponie

APPA : Aquaponie inoculée avec l'agent pathogène *Pythium aphanidermatum*

AP+PA : Aquaponie complémentée inoculée avec *P. aphanidermatum*

HPPA : Hydroponie inoculée avec *P. aphanidermatum*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomal

ITS : *Internal Transcribed Spacer*

TPT : Taux de précision de taxon

TDT : Taux de détection de taxon

VP : Vrai positif

FP : Faut positif

FN : Faux négatif

RDP : *Ribosomal Database Project*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

USDA : *United State Department of Agriculture*

FAO : *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*

PGPB : *Plant Growth Promoting Bacteria*

PAFF Box : *Plant And Fish Farming Box*

QIIME : *Quantitative Insight Into Microbial Ecology*

OTU : *Operational Taxonomic Unit*

PCoA : *Principal Coordonates Analyses*

UV : Ultra-violet

LED : *Light-Emitting Diodes*

## I. CONTEXTE GÉNÉRAL

---

Les systèmes aquaponiques sont définis comme des systèmes de culture hors-sol au cœur de l'innovation combinant l'aquaculture et l'hydroponie. Cependant, les pathogènes des plantes dans ces systèmes et les moyens de gestion de ceux-ci ne sont pas encore clairement développés et ce à cause de la configuration du système. En effet, l'aquaponie est généralement composée d'un système en une boucle où la solution nutritive des plantes retourne dans le compartiment des poissons. De ce fait, l'utilisation de pesticides chimiques et d'agents désinfectants n'est pas autorisée à cause de la présence des poissons. De plus, ces produits pourraient également être toxiques pour les bactéries bénéfiques présentes dans le système (Rakocy, Masser and Losordo, 2006).

Parmi toutes les possibilités de propagation de maladies dans les systèmes de culture hors-sol, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp figure parmi les plus problématiques. En effet, cet Oomycètes est responsable de développements de pourritures sur les racines des plantes et est capable de se disperser rapidement dans les milieux aqueux grâce à sa forme mobile (Postma, Bonants and Van Os, 2001).

Cependant, des articles récents mettent en avant la possibilité que le microbiote naturel ou des effluents d'aquaculture permettrait de procurer une protection contre les pathogènes au système (Gravel *et al.*, 2015; Sirakov *et al.*, 2016). Cette possibilité pourrait ainsi être lié à un phénomène de suppression des pathogènes à travers les modes d'action antagonistes d'un consortium de microorganismes. Ce phénomène ayant déjà été observé en systèmes hydroponiques (Postma, Van Os and Bonants, 2008).

De plus, une expérience *in vitro* a récemment été réalisée dans le laboratoire de l'unité de Phytopathologie et d'Agriculture Urbaine de Gembloux Agro Bio-Tech et a démontré que l'eau aquaponique permettait d'inhiber le développement du mycelium de *P. aphanidermatum*.

## II. INTRODUCTION

---

### 1. Aquaponie

#### 1.1. Introduction et définitions

L'aquaponie peut être définie comme étant un système à eau recirculée combinant la production de plantes en hydroponie et celle de poissons (Delaide *et al.*, 2017). Ce type de système connaît un gain récent en popularité s'inscrivant dans diverses thématiques

Premièrement, il y a un besoin grandissant de revoir notre système de production alimentaire vers des systèmes plus durables (König *et al.*, 2018). Effectivement, cette transition est possible en jouant sur trois paramètres, (i) réduire la consommation de viande, (ii) minimiser le gaspillage alimentaire ou (iii) changer le mode de production (Jan *et al.*, 2016). Un changement de mode de production deviendra de plus en plus inévitable au vu de la raréfaction des ressources naturelles (Jan *et al.*, 2016). Cependant, vouloir changer celui-ci demande de nouvelles technologies et c'est particulièrement dans ce cadre que peut s'inscrire l'aquaponie (Jan *et al.*, 2016; König *et al.*, 2018).

Deuxièmement, l'aquaponie a pour avantage d'être une technologie pouvant faire face à différents grands challenges auxquels notre société va être confrontée, dont ceux de l'agriculture traditionnelle. En effet, l'aquaponie permet de limiter le gaspillage d'eau douce ainsi que de lutter contre le changement climatique et la dégradation des sols. Par-dessus tout, l'atout de l'aquaponie est qu'elle peut être réalisée dans des zones urbaines, dans des climats arides où les sols sont pauvres et où l'eau peut être rare (FAO, 2019). De même que les autres cultures hors-sols, l'aquaponie présente de multiples avantages tels une meilleure production, une conservation de l'énergie, un meilleur contrôle des conditions de croissance et permet au producteur d'être indépendant du sol et de sa qualité (Van Os, 1999).

Finalement, la pratique de l'aquaponie a pour objectif de diminuer les volumes d'eaux usées provenant de l'aquaculture en les nettoyant et en les valorisant en nutriments pour la croissance de plantes (Goddek *et al.*, 2016). En effet, les rejets liés à l'aquaculture sont riches en nutriments et si rejetés dans l'environnement, ils augmenteraient le phénomène d'eutrophisation (Cohen *et al.*, 2018; Endo, 2019).

Comme définit précédemment, l'aquaponie est la combinaison de l'aquaculture et de l'hydroponie. Cependant, pour le bon fonctionnement du système, d'autres compartiments sont nécessaires. Généralement, un système aquaponique est composé au minimum d'un bassin d'aquaculture, d'un filtre mécanique, d'un biofiltre et de l'unité hydroponique.

L'aquaculture mise en œuvre dans un système aquaponique peut s'apparenter à l'aquaculture recirculée. En effet, l'aquaculture recirculée est un système d'élevage et de production d'organismes aquatiques, généralement des poissons, dans lequel l'eau est (partiellement) réutilisée après avoir subi divers traitements, chaque traitement ayant pour objectif de réduire les quantités d'eau à renouveler (Martins *et al.*, 2010; Somerville *et al.*, 2014). Ces traitements se réalisent dans deux compartiments, le clarificateur et le biofiltre (Somerville *et al.*, 2014).

En aquaponie, le traitement de l'eau est réalisé par une filtration mécanique et biologique ainsi que par le biofiltre. Le but premier de ces traitements est de réduire les particules solides dans l'eau tout en les minéralisant, afin d'obtenir une eau sans solide mais riche en nutriments solubilisés disponibles pour les plantes (Delaide *et al.*, 2019). Ainsi, l'eau provenant du bassin d'aquaculture traverse d'abord le filtre mécanique où les particules solides présentes dans l'eau sont séparées (Somerville *et al.*, 2014). Ces particules solides sont principalement composées de déjections de poissons et de restes de nourriture pour poisson (Rakocy, Masser and Losordo, 2006). Séparer ces particules solides permet d'éviter la décomposition de cette matière organique dans le bassin d'aquaculture, cette dernière consommerait l'oxygène dissous, vital pour les organismes vivants du système aquaponique (Somerville *et al.*, 2014). De plus, une accumulation de ces déchets pourrait bloquer le système d'irrigation ou former un film de matière organique autour des racines des plantes et par conséquent de créer une zone anaérobie et diminuer l'absorption des nutriments par la plante (Rakocy, Masser and Losordo, 2006). L'eau traverse ensuite le biofiltre abritant de nombreuses bactéries où elle est à nouveau nettoyée par l'action de ces dernières. Cette partie est généralement située juste après le filtre mécanique et permet un second traitement de l'eau car elle contient encore des substances dissoutes (Somerville *et al.*, 2014). La fonction la plus importante réalisée par ce biofiltre est la détoxification de l'eau, principalement la suppression de l'ammoniac étant toxique en concentration trop élevée pour les poissons (Rakocy, Masser and Losordo, 2006). Il est possible pour ces bactéries de coloniser le biofiltre parce que ce dernier a été optimisé pour abriter les microorganismes sous forme de biofilms grâce à un haut rapport surface (Somerville *et al.*, 2014).

Une fois filtrée, l'eau irrigue les plantes dans l'unité hydroponique. L'hydroponie se base sur la culture de plantes dans une solution contenant les éléments minéraux nécessaires pour la croissance de la plante (Sheikh, 2006). Dans ce système, le substrat n'est pas le sol, à la place, divers médias de croissance inertes, appelés substrats, peuvent être utilisés en tant que support pour la plante et pour le maintien de l'humidité. Ceux-ci peuvent être organiques ou inorganiques (Somerville *et al.*, 2014). Par ailleurs, il existe quatre principaux types d'irrigation en hydroponie, la « technique du film nutritif » (*nutrient film technique*), la culture en eau profonde (*deep water culture*), le goutte à goutte et le système à flux et reflux (*ebb and flow*), plus d'informations sur ces différents systèmes sont disponibles dans la littérature (Hayden, 2006; Sheikh, 2006; Delaide *et al.*, 2017; Forchino *et al.*, 2017; Wongkiew *et al.*, 2017; Endo, 2019).

Enfin, selon le modèle de système aquaponique utilisé, couplé ou découplé, l'eau retourne ou non dans le bassin d'aquaculture (voir partie 1.2 Aquaponie couplée et découplée).

Maintenant que les différents compartiments d'un système aquaponique sont décrits, il convient de mettre en évidence les interactions entre ceux-ci. Afin de faciliter l'analyse, le système peut être résumé en trois ensemble, les poissons, les microorganismes et les plantes (Goddek *et al.*, 2015).

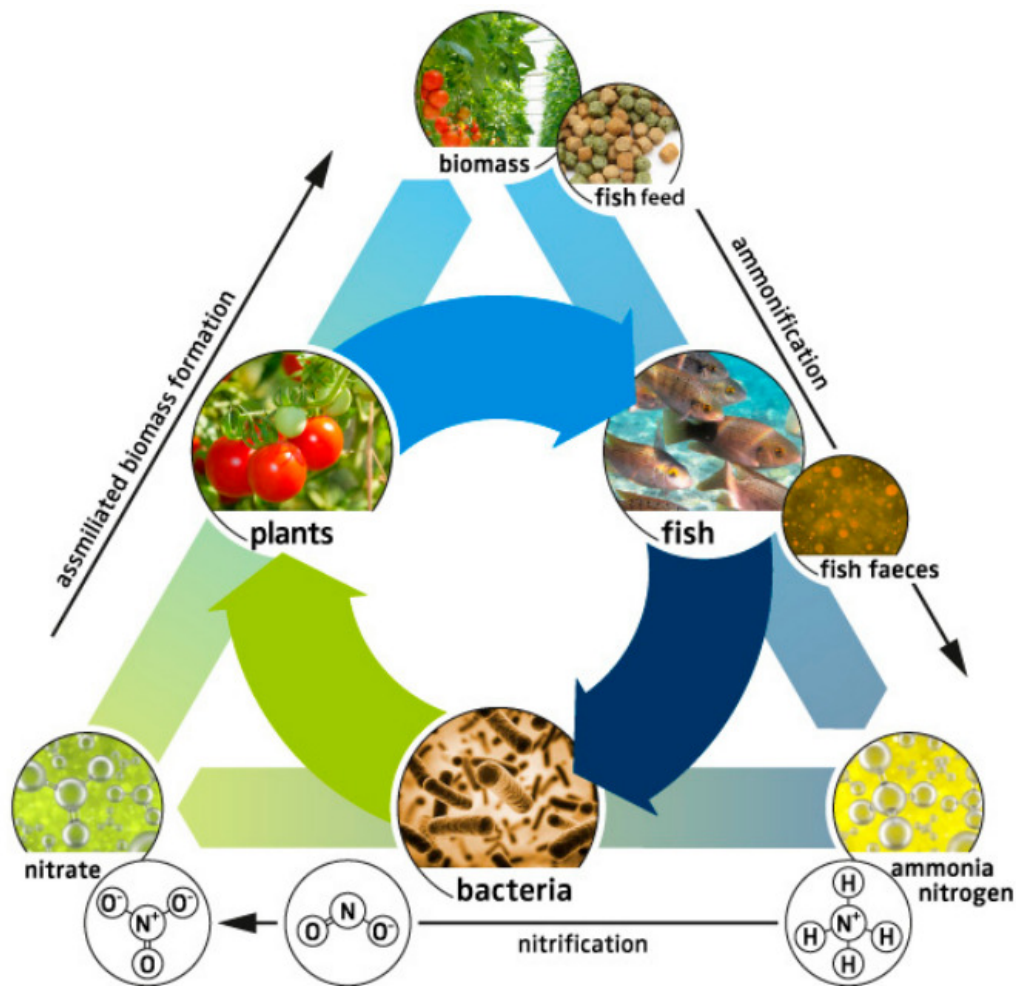


Figure 1: Cycle de l'azote en aquaponie, relation symbiotique entre poissons, plantes et bactéries (Goddek *et al.*, 2015).

Un système d'interaction symbiotique important entre ces trois compartiments est le cycle de l'azote (Figure 1) (Goddek *et al.*, 2015). L'azote n'est apporté presque que par la nourriture des poissons qui est composée d'un haut taux de protéines (Ru *et al.*, 2017). Les protéines sont ainsi digérées par les poissons et excrétées sous forme d'ammoniac ( $\text{NH}_4^+$ ) par les branchies ou dans les matières fécales. L'ammoniac est alors utilisé par les bactéries nitrificatrices autotrophes présentes dans le biofiltre. La première étape de nitrification consiste en l'oxydation de l'ammoniac en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) par les nitroso-bactéries (*Nitrosomonas sp.*, ...) puis de l'oxydation du nitrite en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) par les nitro-bactéries (*Nitrospira sp.*, *Nitrobacter sp.*, ...) (Goddek *et al.*, 2015; Ru *et al.*, 2017). Dès lors, la bioconversion de l'ammoniac présent dans l'aquaponie en nitrate diminue la toxicité que peut avoir l'ammoniac sur les poissons et fournit une source d'azote pour la croissance des plantes (Goddek *et al.*, 2015; Ru *et al.*, 2017).

D'autres interactions sont identifiables en aquaponie mais un accent a été porté sur l'étude des interactions entre les plantes et les microorganismes, plus de détails peuvent être retrouvés dans la partie 2. Interactions plantes-microorganismes



## 1.2. Aquaponie couplée et découplée

Les explications précédentes étaient majoritairement relatives à un système aquaponique dit couplé où l'eau recircule à travers tout le système. Cependant, pour ce type de système, les paramètres de qualité de l'eau sont les mêmes à la fois pour les poissons et les plantes. Ceci est un désavantage majeur car il est nécessaire de réaliser des compromis pour les conditions de croissance des deux systèmes, par exemple en termes de pH, de température et de concentrations en nutriments (Monsees, Kloas and Wuertz, 2017; Goddek *et al.*, 2019). Le découplage de ces deux systèmes permet de réguler la circulation des nutriments d'un compartiment à l'autre ainsi que la qualité de l'eau afin de répondre aux exigences des deux systèmes (Goddek *et al.*, 2016). Cela permettant de réguler entre autres deux facteurs importants, le pH et la température, afin de fournir les conditions optimales pour la croissance des poissons et des plantes tout en affectant positivement la solubilité des minéraux dans la partie hydroponique (Figure 2) (Goddek *et al.*, 2016; Endo, 2019). De même, il est possible de gérer les concentrations en minéraux des eaux usées à la sortie de l'unité d'aquaculture ainsi que les déficiences en éléments et de pouvoir les combler avec un fertilisant hydroponique (Endo, 2019). Lorsque ce découplage permet l'ajout d'éléments minéraux, on parle d'aquaponie complémentée (voir partie 1.2.1 Aquaponie découplée).

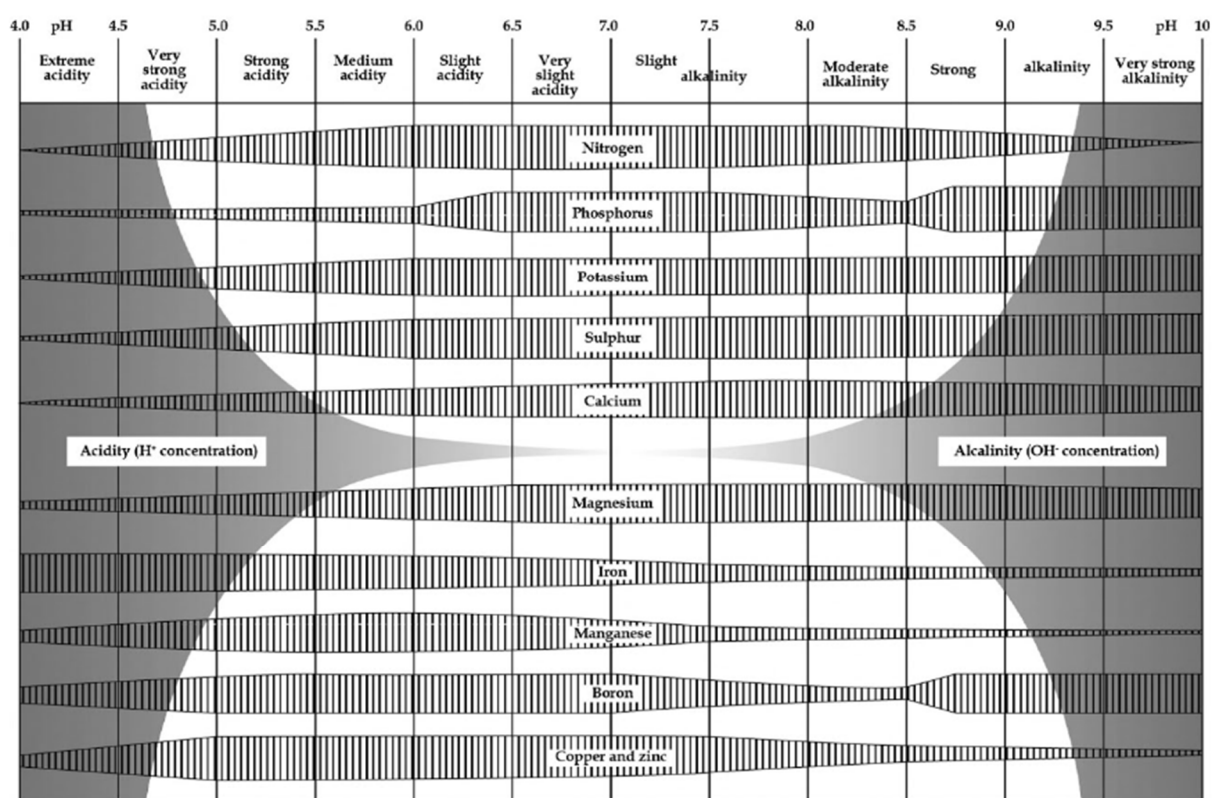


Figure 2 : Disponibilité en minéraux dans une solution nutritive hydroponique (Trejo-Téllez and Gómez-Merino, 2012).

Par ailleurs, lors du passage à un niveau de production industrielle, il a été mis en évidence un besoin d'augmenter la viabilité économique de ce genre de système (Goddek *et al.*, 2019). Cela pouvant être optimisé à travers un découplage des parties d'aquaculture et d'hydroponie afin

d'assurer les conditions de croissance optimales pour les plantes et les poissons, l'aquaponie dite découplée (Forchino *et al.*, 2017; Goddek *et al.*, 2019).

Bien qu'étant des circuits d'eau indépendants, afin de balancer les pertes d'eau dues à l'évapotranspiration réalisée par les plantes, le système hydroponique est rechargé en eau provenant du système d'aquaculture. Cela permet également d'apporter une eau chargée davantage en éléments minéraux. Par conséquent, tout retrait d'eau du système d'aquaculture est compensé par l'ajout d'eau propre et chargée en nutriments (Goddek *et al.*, 2016; Endo, 2019). Cependant, en considérant le fait que le remplacement de l'eau du système hydroponique est uniquement basé sur le taux d'évapotranspiration des plantes, il a été observé de trop basses concentrations en nutriments dans l'eau hydroponique. De ce fait, la consommation en nutriments est plus importante que le renouvellement de ceux-ci. Par conséquent, les nutriments ont tendance à s'accumuler dans le système d'aquaculture recirculée quand les taux d'évapotranspiration sont bas (Goddek *et al.*, 2019).

#### 1.2.1. Aquaponie complémentée

Pour d'éventuels problèmes de carences en éléments minéraux dans le cas d'un système découplé, ces derniers peuvent être ajoutés dans l'eau du système hydroponique, on parle dès lors l'aquaponie complémentée. En effet, contrairement à un système hydroponique où les apports en nutriments sont étudiés pour rencontrer les besoins nécessaires pour la croissance des plantes, en aquaponie, la source majeure de nutriments provient de l'eau du bassin des poissons, et plus précisément de leur nourriture, qui contient des composés minéraux solubles et solides qui seront ensuite assimilés par les plantes (Goddek *et al.*, 2015). Cependant, ces apports couvrent les besoins nutritionnels des poissons mais ne couvrent pas toujours les besoins de la plante. De même, un suivi régulier des concentrations en minéraux doit être effectué afin de pouvoir en ajuster les concentrations tout en ayant le moins d'impacts sur le fonctionnement du système (Graber and Junge, 2009; Goddek *et al.*, 2015; Endo, 2019). Par conséquent, il a été observé dans des systèmes aquaponiques non complémentés que des nutriments essentiels pour la plante étaient présents en faibles quantités comme le phosphore (P), le potassium (K), le fer (Fe) et le manganèse (Mn) (reviewé par Ru *et al.*, 2017). Cela peut avoir pour effet une plus faible croissance de la plante ou une moins bonne qualité des fruits produits dans le cas de la tomate (Graber and Junge, 2009; Ru *et al.*, 2017).

Delaide *et al.* (2016) ont comparé les rendements lors de la complémentation en nutriments d'une eau aquaponique, afin d'atteindre les concentrations mesurées en hydroponie, aux rendements mesurés en aquaponie et en hydroponie. Cette expérience a permis de mettre en évidence qu'il y a une hausse significative du taux de croissance en aquaponie complémentée de 39% par rapport au contrôle hydroponique tandis que l'eau aquaponique montrait une croissance de la plante similaire au contrôle hydroponique.

## 2. Interactions plante-microorganismes

Les plantes et les microorganismes y étant associés peuvent s'influencer dans une variété d'écosystèmes, comprenant à la fois ceux à l'intérieur de la plante et ceux y étant environnants, l'ensemble de ces derniers étant appelé le phytobiome (Leach *et al.*, 2017). Ainsi, la plante est

également influencée par un certain nombre de facteurs abiotiques, tels que la température, le pH, l'eau, les nutriments disponibles, etc. et par des facteurs biotiques tels les microorganismes, nématodes, protozoaires, etc. Les communautés microbiennes natives de ces écosystèmes et leurs interactions peuvent être influencées par l'ensemble de ces facteurs (Lugtenberg, 2015).

Ici, les interactions qui se déroulent dans trois microbiomes du phytobiome sont plus particulièrement étudiées : la rhizosphère, la rhizoplane et l'endosphère. En pleine terre, la rhizosphère est considérée comme étant la partie du sol directement influencé par le système racinaire de la plante. En hydroponie, la distinction est plus floue en raison du mouvement de la solution nutritive dans le système et de ce fait autour des racines. On considérera la rhizosphère en hydroponie et en aquaponie comme étant l'eau d'irrigation ou encore plus précisément les zones d'eau immobiles ou stagnantes autour des racines (Maruyama *et al.*, 2018). La rhizoplane peut être considérée comme étant la surface des racines, le microbiote associé étant lié à la surface des racines (Postma, Van Os and Bonants, 2008). Tandis que l'endosphère est la zone correspondant aux tissus présents dans la plante où résident des microorganismes endophytes (Maruyama *et al.*, 2018).

Les microorganismes présents dans ces microbiomes peuvent avoir des effets bénéfiques, neutres ou négatifs sur la croissance de la plante (Lugtenberg, 2015). Pour les organismes bénéfiques, on parlera le plus généralement de PGPM (*Plant Growth Promoting Microorganism*), d'agents antagonistes ou d'éliciteurs (Whipps, 2001). Ces organismes augmentent indirectement la croissance de la plante ou permettent la suppression de maladies causées par des agents phytopathogènes (voir partie 0. La sonication implique l'application d'ondes à hautes fréquences sur la solution nutritive en vue d'inactiver les agents pathogènes avant leur entrée dans le système de production (Bazyar Lakeh *et al.*, 2013; Mori and Smith, 2019). En pratique, une sonde est utilisée pour transmettre des ondes de 20 à 40 kHz dans l'eau (Albright *et al.*, 2007). Ce procédé provoque un phénomène de cavitation ce qui signifie la formation de bulles de vapeur sous basses pressions et leur éclatement. L'éclatement de ces bulles dans la solution crée des conditions extrêmes dans lesquelles les cellules sont détruites (Albright *et al.*, 2007).

Cette méthode pourrait être applicable afin de réduire les populations d'Oomycètes tel *Pythium* en ayant un moindre impact sur les populations de bactéries bénéfiques. En effet, il a été constaté qu'un traitement par sonication inactivait les zoospores de *Pythium* tandis que 75% des cellules de *Pseudomonas* restaient viables. Ce phénomène s'explique par le fait que les zoospores de *Pythium* sont plus larges que les cellules de bactéries et sont de ce fait plus sensibles à la sonication (Tu, J. C., Zhang, 2000).

## **2.1. Désinfection chimique**

Certaines méthodes employant des moyens chimiques sont disponibles et ont déjà été testées pour l'aquaculture et des systèmes hydroponiques en vue d'améliorer la qualité de l'eau et de réduire les populations d'agents pathogènes. Cependant, ces méthodes : l'utilisation de surfactants, la chloration et l'ozonation, peuvent avoir des impacts négatifs sur la santé des poissons et des plantes. Quand ces méthodes sont utilisées, un système permettant de pomper

l'eau dans une cuve séparée afin de la traiter et d'en retirer les composés toxiques est nécessaire (Hong and Moorman, 2005; Mori and Smith, 2019).

#### 2.1.1. Surfactant

L'utilisation de surfactants non-ionique présente une bonne efficacité lorsque la source principale de propagation de maladies est les zoospores d'Oomycètes tels *Pythium*, *Phytophthora* et *Olpidium* (Schnitzler, 2004). Les surfactants provoquent la perte de mobilité et la lyse des zoospores tandis qu'à plus haute concentration, ils peuvent également inhiber totalement la formation de zoospores et de vésicules (Stanghellini and Tomlinson, 1987). En effet, les surfactants permettent de tuer rapidement les structures cellulaires sans paroi cellulaire, rendant les zoospores et vésicules plus sensibles à ce traitement (Stanghellini *et al.*, 1996). Par conséquent, les autres stades de développement tels le mycélium et les zoospores enkystés ne sont pas affectés par les surfactants (Stanghellini and Tomlinson, 1987).

#### 2.1.2. Chloration

Le chlore peut être ajouté de différentes manières telles que des granulés, injection gazeuse et par électrolyse de chlorure de sodium (Hong and Moorman, 2005). Le chlore agit sur les cellules en pénétrant dans celles-ci et en réagissant avec les composés intracellulaires sans réaliser de dommages significatifs en surface ou affecter la perméabilité membranaire (Cho *et al.*, 2010). L'efficacité de cette méthode est influencée par le pH de l'eau, la teneur en composés organiques et inorganiques, la charge microbienne dans l'eau ainsi que le stade de vie de l'agent pathogène. Cependant, les concentrations nécessaires afin d'éliminer les agents pathogènes de plantes sont connues comme pouvant être toxiques pour les plantes et les poissons (Zillich, 1972; Hong and Moorman, 2005). Comme pour les surfactants, chaque stade de vie n'a pas la même sensibilité au chlore. En effet, les kystes et les zoospores s'avèrent être plus sensibles que les sporanges, hyphes, conidies et mycéliums (Cayanan *et al.*, 2009).

#### 2.1.3. Ozonation

L'ozone ( $O_3$ ) est un agent oxydant puissant qui réagit lorsqu'il entre en contact avec la matière organique. Selon le temps d'exposition et la concentration en ozone, cette méthode est capable de tuer tous les organismes présents dans l'eau notamment grâce à l'altération de la perméabilité de la membrane cellulaire (Arana *et al.*, 1999; Postma, Van Os and Bonants, 2008). Contrairement à la chloration, l'ozone ne pénètre pas dans la cellule et n'effectue des dommages qu'en surface (Cho *et al.*, 2010).

L'ozone est produit à partir d'air sec et d'électricité et utilisant un générateur d'ozone, provoquant la réaction suivante :  $3O_2 \rightarrow 2O_3$ . L'air enrichi en ozone est alors injecté dans l'eau (Postma, Van Os and Bonants, 2008).

Cependant, l'ozone réagit également avec les chélates de fer, provoquant sa précipitation et son dépôt dans le système d'irrigation. Le fer est rendu non disponible pour la plante et de plus hauts dosages sont nécessaires (Postma, Van Os and Bonants, 2008). Par ailleurs, en présence de certains composés tels que le brome ( $Br^-$ ), l'ozonation entraîne la formation de sous-produits qui pourraient avoir des effets toxiques (Wu *et al.*, 2019).

Contrôle biologique) mais peuvent également réaliser d'autres activités telles que la fixation de l'azote, la solubilisation de nutriments, la promotion de fonctions mycorhizales, le libération de phytohormones et la diminution de la toxicité en métaux lourds (reviewé par Whipps, 2001).

En hydroponie, plusieurs genre de bactéries et de champignons ont été identifiés comme étant des organismes bénéfiques, on peut retrouver certaines espèces ou souches parmi des genres tels que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Gliocladium* et *Trichoderma* (reviewé par Lee and Lee, 2015). Certains de ces organismes bénéfiques ont ainsi été cultivés et formulés et sont désormais des produits commercialisés et appliqués en tant que biopesticides ou produits de protection de la plante (Lugtenberg, 2015).

Cependant, des microorganismes, appelés agents phytopathogènes, ont des effets négatifs sur la plante et peuvent introduire l'apparition de symptômes (déviation du phénotype) et de dégâts sur les plantes cultivées, limitant ainsi le rendement. Ils sont également présents dans les systèmes de culture hors-sol et sont abordés dans la partie 3.3 En aquaponie, les sources d'inoculum peuvent être considérées comme étant les mêmes qu'en hydroponie en serre et sont principalement liées à l'approvisionnement en eau, à l'entrée de plantes, graines ou poissons infectés, au matériel de croissance tels les différents médias de croissance, aux échanges d'air avec l'extérieur qui peuvent introduire poussières et particules, aux vêtements du personnel, à des insectes vecteurs d'agents pathogènes (Jarvis, 1992; Stanghellini and Rasumussen, 1994; Paulitz, 1997; Hong and Moorman, 2005; Nozzi *et al.*, 2016).

L'utilisation d'une lutte intégrée permet de produire et de protéger les plantes grâce à l'utilisation de différentes stratégies et pratiques de management afin de produire des plantes saines en minimisant l'utilisation de pesticides (Bouhssini and Trissi, 2019). Ce principe de management se base sur l'utilisation de différents seuils qui vont justifier l'intervention sur la culture afin d'en limiter les pertes. Il sera question du seuil de préjudice économique lorsque la population d'agent pathogène correspond à la plus basse densité de population qui cause des dommages économiques et où les dommages économiques sont la quantité de préjudices qui vont justifier le coût de mesures de contrôle (Stern *et al.*, 1959). On parle également de seuil économique d'intervention ou seuil d'action qui correspond au niveau de densité de la population d'agents pathogènes à laquelle l'utilisation de moyens de contrôle est justifiée car permet de prévenir la population d'augmenter jusqu'au seuil de préjudice économique (Stern *et al.*, 1959; Bouhssini and Trissi, 2019). En dessous de ce seuil, il n'y aurait pas de perte économique significative sur la culture qui justifierait d'augmenter les coûts suite à l'utilisation de moyens de contrôles (Bouhssini and Trissi, 2019).

Agents pathogènes dans les systèmes de culture hors-sol.

### **3. Maladies dans les systèmes de culture hors-sol**

Les systèmes de culture hors-sol, par leur structure non dépendante du sol sur lequel ils se trouvent, étaient supposés être la solution pour se défaire des agents pathogènes du sol retrouvés dans les autres méthodes d'agriculture traditionnelle (Stanghellini and Rasmussen, 1994; Koohakan *et al.*, 2004; Nozzi *et al.*, 2016). Cependant, ces systèmes restent sous la menace d'agents pathogènes pouvant affecter les plantes cultivées ou leurs racines (Stanghellini and

Rasumussen, 1994; Koohakan et al., 2004; Nozzi et al., 2016). De plus, il est important de mettre en évidence que l'aquaponie étant la combinaison de deux systèmes, l'aquaculture et l'hydroponie, elle combine les risques des deux systèmes et est donc encore plus susceptible à la propagation d'agents pathogènes dans le système à eau recirculée (Goddek et al., 2015; FAO, 2019). Bien que des agents pathogènes de poissons puissent également être retrouvés en aquaponie, dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée aux agents pathogènes de plantes.

### **3.1. Cycle épidémiologique**

Afin de comprendre le mode d'action des agents pathogènes et les maladies qu'ils peuvent induire sur la plante, il paraît important de maîtriser la notion de cycle épidémiologique. Tout d'abord, le cycle épidémiologique peut être défini comme étant un ensemble de compartiments ou d'étapes qui correspondent aux différents changements d'état du parasite et de la maladie. Ces étapes se succèdent sous l'effet de facteurs extérieurs à l'épidémie susceptibles de l'influencer (Sache, 2003). Un cycle épidémiologique peut correspondre à un cycle du développement du parasite, qui ne se reproduit qu'une seule fois par année ou par production, il est dès lors qualifié de monocyclique. Cependant, dans la majorité des cas, une épidémie est caractérisée par la répétition et la juxtaposition des monocycles, on parle dès lors d'épidémie polycyclique (Sache, 2003).

Ainsi qu'énoncé précédemment, un cycle est composé de plusieurs compartiments (Figure 3).

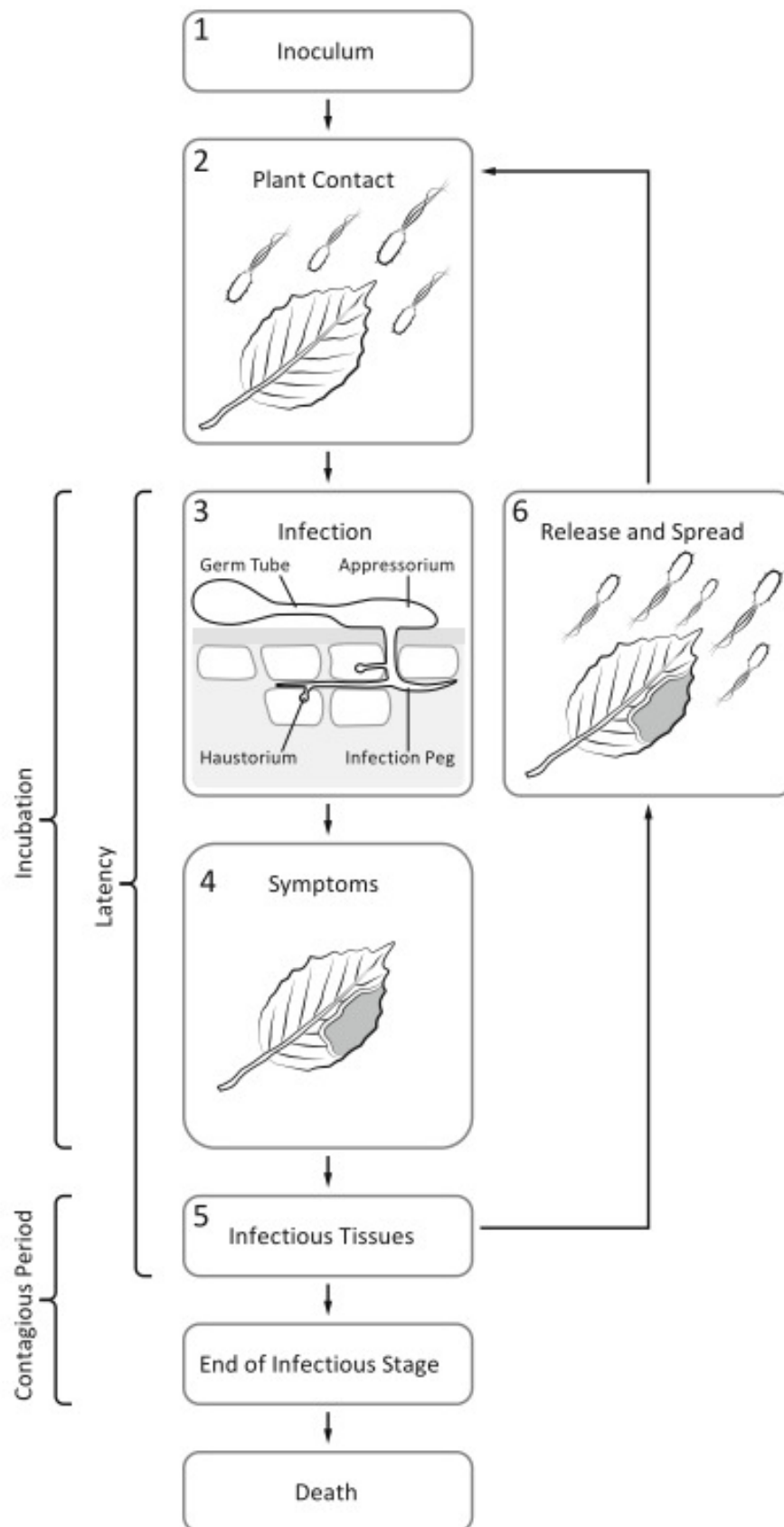


Figure 3: Etapes de base du cycle épidémiologique (Stouvenakers *et al.*, 2019)

La première étape est l'entrée de l'agent pathogène dans le système de culture, cela représente l'inoculum (Sache, 2003).

Ensuite, la deuxième étape est l'entrée en contact de l'inoculum avec la plante. Cependant, l'entrée en contact de l'agent pathogène avec la plante ne signifie pas toujours qu'une infection aura lieu. En effet, l'étape d'infection peut être composée de plusieurs sous-étapes et la bonne réalisation de ces dernières est nécessaire au succès de l'infection. L'efficacité de cette infection étant principalement modulée par la température et l'humidité. Bien que chaque agent pathogène ait ses propres température et humidité optimales, une température et humidité élevées favoriseraient l'étape d'infection (Sache, 2003).

Une fois l'infection réussie, il s'écoule une période durant laquelle aucun symptôme n'est visible à l'œil nu, cette période peut être décrite comme de latence ou d'incubation mais elles ne correspondent pas exactement à la même chose. En effet, la période d'incubation correspond à la période entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes tandis que la période de latence correspond au temps entre l'infection et la production de germes infectieux. Ces deux périodes n'étant pas toujours équivalentes car certains symptômes peuvent se déclarer avant la production de germes infectieux (Sache, 2003).

S'en suit une période infectieuse qui est le laps de temps pendant lequel une lésion produit des spores. Durant celle-ci, l'agent pathogène est capable de disséminer ses germes afin d'étendre l'épidémie à d'autres plantes ou de réinfecter l'organe déjà infecté et ainsi augmenter la durée de la période infectieuse (Sache, 2003).

L'étape de dissémination est composée de trois phases distinctes : la libération, le transport et le dépôt de l'inoculum. La libération consiste en la libération des spores dans le milieu ambiant. Ce mécanisme peut être actif si l'organe sporifère fournit lui-même l'énergie nécessaire à cette libération ou passif si l'organe ne contribue pas à la libération des spores. Dans ce dernier cas, un mouvement d'air est très souvent impliqué dans cette libération (Sache, 2003). Ensuite, le transport peut s'effectuer de différentes manières selon l'agent pathogène et l'organe infecté. Comme il sera expliqué plus tard, les agents pathogènes tels les Oomycètes peuvent s'attaquer aux racines, leurs zoospores pouvant se propager dans l'eau en recirculation. Pour les autres agents pathogènes tels les champignons, bactéries et virus, s'attaquant aux racines ou aux parties aériennes de la plante, la dispersion a lieu par des éclaboussures d'eau, un opérateur s'il entre en contact avec l'organe infecté ou des courants d'air (Sache, 2003). L'efficacité de dissémination n'est pas toujours relative à la quantité d'inoculum mais aussi à d'autres facteurs tels que la disponibilité de tissus hôte, un changement de résistance de l'hôte, à la dispersion de l'inoculum, etc. (Jarvis, 1992).

Une fois la phase d'infection terminée, les cellules meurent et le cycle épidémiologie est terminé (Sache, 2003).

### **3.2. Sources d'inoculum**

En aquaponie, les sources d'inoculum peuvent être considérées comme étant les mêmes qu'en hydroponie en serre et sont principalement liées à l'approvisionnement en eau, à l'entrée de plantes, graines ou poissons infectés, au matériel de croissance tels les différents médias de



croissance, aux échanges d'air avec l'extérieur qui peuvent introduire poussières et particules, aux vêtements du personnel, à des insectes vecteurs d'agents pathogènes (Jarvis, 1992; Stanghellini and Rasumussen, 1994; Paulitz, 1997; Hong and Moorman, 2005; Nozzi *et al.*, 2016).

L'utilisation d'une lutte intégrée permet de produire et de protéger les plantes grâce à l'utilisation de différentes stratégies et pratiques de management afin de produire des plantes saines en minimisant l'utilisation de pesticides (Bouhssini and Trissi, 2019). Ce principe de management se base sur l'utilisation de différents seuils qui vont justifier l'intervention sur la culture afin d'en limiter les pertes. Il sera question du seuil de préjudice économique lorsque la population d'agent pathogène correspond à la plus basse densité de population qui cause des dommages économiques et où les dommages économiques sont la quantité de préjudices qui vont justifier le coût de mesures de contrôle (Stern *et al.*, 1959). On parle également de seuil économique d'intervention ou seuil d'action qui correspond au niveau de densité de la population d'agents pathogènes à laquelle l'utilisation de moyens de contrôle est justifiée car permet de prévenir la population d'augmenter jusqu'au seuil de préjudice économique (Stern *et al.*, 1959; Bouhssini and Trissi, 2019). En dessous de ce seuil, il n'y aurait pas de perte économique significative sur la culture qui justifierait d'augmenter les coûts suite à l'utilisation de moyens de contrôles (Bouhssini and Trissi, 2019).

### **3.3. Agents pathogènes dans les systèmes de culture hors-sol**

Les systèmes de culture hors-sols sont sujets à de nombreux agents phytopathogènes et certaines études visent à dresser l'inventaire de ces derniers ainsi que leurs moyens de propagation et les symptômes qu'ils peuvent causer aux plantes. Ces derniers sont à l'heure actuelle principalement étudiés en hydroponie et dans des systèmes d'irrigation (Hong and Moorman, 2005; Postma, Van Os and Bonants, 2008; Vallance *et al.*, 2010).

Parmi les microorganismes pathogéniques couramment détectés, une menace majeure réside dans la présence d'Oomycètes pathogènes tels que *Pythium* et *Phytophthora* (Postma, Van Os and Bonants, 2008; Vallance *et al.*, 2010). Ces organismes sont généralement considérés comme étant bien adaptés aux environnements aquatiques. En effet, une majorité des membres de ces genres sont capables de former des zoospores, spores flagellés capables de se déplacer de manière active dans ces environnements (reviewé par Hong and Moorman, 2005). Une fois dans le système d'irrigation de l'eau, ces zoospores peuvent attaquer les racines et entraînent le développement de pourriture sur ces dernières. Dans des conditions favorables, la multiplication des zoospores de ces Oomycètes et leur dispersion dans l'environnement peut être explosive et produire une infection de la plante hôte en quelques minutes (Postma, Van Os and Bonants, 2008).

Les systèmes de culture hors-sol sont également sujets à d'autres agents pathogènes tels des bactéries, champignons et virus, plus d'informations sur ces derniers peuvent ainsi être dans les reviews de la littérature réalisée par Hong et Moorman (2005), Postma, Van Os et Bonants (2008) et Vallance *et al* (2010).

Finalement, une enquête a été réalisée en 2018 auprès de personnes pratiquant l'aquaponie sur les agents pathogènes ainsi que les symptômes développés par les plantes qu'ils rencontrent dans leurs systèmes de culture (Stouvenakers *et al.*, 2019). Cette enquête met en avant que les plantes en aquaponie sont bel et bien sujets aux agents pathogènes et que les mesures de contrôles de ces derniers ne sont pas toujours maîtrisées par ces pratiquants. Ainsi, certains agents pathogènes ont été identifiés grâce aux symptômes développés par les parties aériennes ou les racines des plantes. De même, lorsque les symptômes n'étaient pas aisément reliables à un agent phytopathogène, la présence de ceux-ci a également été répertoriée, bien que ces derniers pourraient aussi être la conséquence de stress abiotiques (Stouvenakers *et al.*, 2019).

#### **4. Lutte contre les agents pathogènes**

La lutte contre les agents pathogènes est un grand challenge en aquaponie. En effet, un système aquaponique est caractérisé par un microbiote plus diversifié qu'un système hydroponique et ce à cause de l'intégration d'unités d'aquaculture et de biofiltration dans la même boucle d'eau (Somerville *et al.*, 2014). De manière générale, l'aquaponie est composée de plantes, de poissons et de bactéries. Les moyens de lutte contre les agents pathogènes tels les antibiotiques utilisés en aquaculture ou les pesticides utilisés en hydroponie ne sont plus utilisables en aquaponie car ils seraient toxiques pour les autres composantes vivantes du système (Nichols and Savidov, 2012; Goddek *et al.*, 2015). Il devient nécessaire de développer des moyens de lutte contre les agents pathogènes et les maladies qui minimisent les impacts sur l'ensemble du système.

Cependant, même si aucun agent pathogène n'est détecté dans le système, il reste important de préserver les conditions n'entraînant pas le développement de maladies ou le cas échéant d'effectuer des traitements afin d'en prévenir l'apparition mais aussi, s'il est présent, l'aggravation ou la propagation. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les « bonnes pratiques agricoles » ou GAP (*Good Agricultural Practices*). Selon la FAO, les GAP sont une série de principes à appliquer aux étapes de production et de post-production qui permettent de produire de manière sûre et saine des produits destinés à l'alimentation ou non, tout en prenant en compte les aspects économiques, sociaux et de durabilité environnementale (FAO, 2016). Dans le cadre de l'aquaponie, le département de l'agriculture des Etats Unis a publié en 2018 une note reprenant les principaux critères à respecter afin d'être certifié comme appliquant les GAP (USDA, 2018).

Il existe trois catégories de traitements pour lutter contre les agents pathogènes qui sont applicables en aquaponie : les traitements physiques, chimiques et biologiques. Les moyens physiques et chimiques jouent principalement sur la désinfection de l'eau afin d'éliminer ou d'inhiber les agents pathogènes tandis que les moyens biologiques utilisent des microorganismes vivants pour lutter contre ces derniers (Whipps, 2001; Mori and Smith, 2019).

##### **4.1. Désinfection physique**

Le contrôle ou la désinfection physique est défini comme étant une méthode de désinfection qui ne repose pas sur l'utilisation de produits chimiques ou d'agents biologiques. En aquaponie, six méthodes physiques de désinfections pourraient être utilisées et sont décrites dans la

littérature : l'irradiation ultraviolette (UV), les diodes électroluminescentes (LED), le milieu de filtration, la membrane de filtration, la chaleur et la sonication (Mori and Smith, 2019). Celles-ci ne sont pas toujours utilisées ou prouvées comme étant efficaces dans un système aquaponique mais font l'objet de pistes de méthodes qui pourraient être utilisées pour lutter contre les agents pathogènes.

#### 4.1.1. Irradiation ultraviolette (UV)

La désinfection par ultraviolet dans les systèmes de culture hors-sol implique l'exposition de l'eau à une lumière germicide allant de 200 à 280 nm (Sholtes *et al.*, 2016; Mori and Smith, 2019). La principale mesure de l'efficacité de la désinfection UV est la dose, influencée par divers facteurs tels que la réflexion, réfraction, intensité de la lumière et le temps d'exposition, qui est la quantité d'énergie reçue par unité de surface sur une période de temps. Cette dose détermine si les microorganismes dans l'eau perdent leur viabilité et s'ils sont inactivés (Hijnen, Beerendonk and Medema, 2006). Cette technique endommage l'ADN qui va perturber la réplication et endommage l'ARNm (Xu *et al.*, 2018). Généralement, les bactéries sont les plus affectées, suivies des protozoaires, des virus et des spores de bactéries (Hijnen, Beerendonk and Medema, 2006). Cependant, l'eau traitée doit contenir le moins de particules possibles, être propre et relativement non colorée, certains de ces facteurs pouvant être ajustée avec une filtration (Hong and Moorman, 2005).

#### 4.1.2. Diodes électroluminescentes (LED)

La désinfection par diodes lumineuses se réalise en émettant une lumière allant de 400 à 470 nm (Wang *et al.*, 2017). Bien que le mécanisme d'action des LED ne soit pas encore totalement compris, une hypothèse est que cette lumière excite naturellement des chromophores sensibles à cette lumière dans la cellule microbienne et provoque la production de dérivés réactifs de l'oxygène cytotoxiques (Wang *et al.*, 2017). Dans le cadre d'un système aquaponique, l'implémentation de cette technique de désinfection impliquerait le placement de ces lampes LED au-dessus du compartiment dédié aux poissons (Mori and Smith, 2019). Cependant, les études réalisées sur cette technique ne concernaient encore que l'élimination d'agents pathogènes dans de l'eau d'aquaculture (Roh, Kang, *et al.*, 2018; Roh, Kim, *et al.*, 2018)

#### 4.1.3. Milieu de filtration

Cette technique est basée sur la filtration de la solution nutritive afin d'en séparer les agents pathogènes présents dans celle-ci. Les matériaux étant les plus communément employés sont le sable et la laine de roche (Boller and Kavanaugh, 1995). Cette filtration peut avoir lieu soit avant l'entrée de l'eau dans le système, soit à la sortie du système afin de prévenir la recirculation des agents pathogènes (reviewé par Mori and Smith, 2019). En outre, elle permet principalement de retenir les débris organiques, les microorganismes et les virus (Arndt and Wagner, 2003).

Cette méthode de filtration peut être qualifiée de rapide ou de lente, principalement basé sur le débit d'eau filtré (Arndt and Wagner, 2003). La filtration rapide utilise des débits de 4167 à 19 792 l/m<sup>2</sup>h tandis que la filtration lente utilise des débits de 42 à 334 l/m<sup>2</sup>h (Arndt and Wagner,

2003; Mori and Smith, 2019). L'efficacité du système dépend également d'autres facteurs telles que la composition du milieu, la température de l'eau, l'accumulation de débris et la fréquence de lavage à contre-courant du système (Arndt and Wagner, 2003).

La filtration lente combine un procédé à la fois mécanique et biologique. En effet, une filtration mécanique se produit lorsque les particules sont retenues par le filtre, tandis que la filtration est biologique lorsque les microorganismes présents dans la solution nutritive interagissent avec ceux qui grandissent déjà sur et dans le milieu de filtration (Arndt and Wagner, 2003; Hijnen *et al.*, 2004; Guchi, 2015). Ce mécanisme de filtration biologique peut se dérouler grâce au bas débit d'eau mais aussi par le sable utilisé qui permet la formation de biofilm dans les premières couches du lit de sable même si des activités de prédateurs pourraient également s'y dérouler (Huisman and Wood, 1974; Guchi, 2015). Cependant, plus l'accumulation de ces microorganismes, combinée à l'accumulation de débris présents dans l'eau, sera importante plus il sera important d'augmenter la fréquence de lavage à contre-courant du système (Arndt and Wagner, 2003).

L'efficacité de ces systèmes vis-à-vis de certains agents pathogènes présents dans les systèmes de culture hors-sol a déjà été expérimentée avec des systèmes de filtration lente. En effet, il a été établi que le taux de suppression était toujours supérieur à 90% et dans le cas des agents pathogènes *Pythium* et *Phytophthora*, des taux de 100% ont été constatés (reviewé par Mori and Smith, 2019).

Concernant la filtration rapide, celle-ci permet de filtrer des volumes plus élevés que la filtration lente, et pourrait par conséquent être plus adaptées pour des systèmes de production importants que la filtration lente (Arndt and Wagner, 2003; Mori and Smith, 2019). Cependant, le phénomène d'accumulation de débris se réaliserait plus rapidement et requerrait des lavages à contre-courant plus fréquents (Arndt and Wagner, 2003).

Dans le cas de l'aquaponie, ce phénomène d'accumulation de débris pourrait poser problèmes quant à l'utilisation de ces méthodes. En effet, ce système présente une haute quantité de particules solides en suspension qui pourraient accélérer le phénomène d'accumulation de débris (Mori and Smith, 2019).

#### 4.1.4. Filtration sur membrane

La filtration sur membrane peut être utilisée afin de retirer de la solution à la fois les particules et les substances dissoutes d'origine organique ou inorganique, incluant les substances microbiologiques (Lekang, 2013). Cette méthode présente de nombreux avantages tels que : (i) la séparation jusqu'à une taille ionique, (ii) la non utilisation de produits chimiques, (iii) phase de transfert non couteuse, (iv) ne nécessite pas beaucoup d'espace, (v) le *scale-up* est facile, (vi) le système peut être automatisé et (vii) le système peut être adapté (Lekang, 2013).

Ces systèmes permettent d'éliminer les propagules infectieuses de champignons, les bactéries et les nématodes pathogènes de l'eau en recirculation (Schuerger and Hammer, 2009). Pour ce faire, il est important de sélectionner la bonne taille de pores, qui détermine ce qui sera rejeté de ce qui ne le sera pas (Lekang, 2013). En effet, la microfiltration avec des tailles de pores de 10 à 100 nm est généralement utilisée pour cette application et permet de filtrer à des débits

supérieurs à 200 l/m<sup>2</sup>h (Lekang, 2013). Cependant, plus la taille des pores diminue plus le risque d'encrassement de la membrane augmente, réduisant le débit de l'eau et la différence de pression à travers la membrane et par conséquent l'efficacité du système. Une solution est d'utiliser un préfiltre à pore plus larges (de 10 à 100 µm) afin de retenir les débris les plus grossiers (Schuerger and Hammer, 2009). Des produits chimiques tel le peroxyde d'hydrogène peuvent également être utilisés en tant que traitement contre l'obstruction de la membrane (Schuerger and Hammer, 2009). Néanmoins, l'utilisation de produits chimique doit être prise en considération s'ils sont utilisés dans le cadre de l'aquaculture, hydroponie ou aquaponie (Mori and Smith, 2019).

#### 4.1.5. Traitement par la chaleur

Le traitement par la chaleur, ou pasteurisation, est basé sur un échange de chaleur à travers une paroi conductrice où de l'eau en ébullition chauffe de l'eau froide. Cette eau est ensuite traitée jusqu'à la température requise pendant un temps défini (par exemple 95°C pendant 30s), après quoi l'eau traitée est refroidie (Runia, 1988; Runia and Amsing, 2001). La chaleur dégagée lors du refroidissement de l'eau traitée est réutilisée pour chauffer de l'eau non traitée (Runia and Amsing, 2001). Ce traitement par la chaleur permet de dénaturer les protéines des agents pathogènes, les rendant inoffensifs (Mori and Smith, 2019).

Cette méthode permet une inactivation efficace des agents pathogènes de poissons et de plantes dans l'eau. Cependant, selon les organismes, les températures et temps d'exposition varient largement. De manière générale, plus la température d'inactivation sera élevée, plus le temps de traitement nécessaire sera court (reviewé par Mori and Smith, 2019).

Néanmoins, certaines études ne se concentrent pas principalement sur l'inactivation d'agent pathogène mais sur l'impact qu'a la réduction de ce dernier sur les symptômes développés par les plantes ou les poissons (Mori and Smith, 2019). Il a été observé dans un système hydroponique qu'un traitement thermique à 60°C pendant une minute contre *P. aphanidermatum* permettait de réduire de plus de 95% les dommages occasionnés aux racines (Albright *et al.*, 2007).

#### 4.1.6. Sonication

La sonication implique l'application d'ondes à hautes fréquences sur la solution nutritive en vue d'inactiver les agents pathogènes avant leur entrée dans le système de production (Bazyar Lakeh *et al.*, 2013; Mori and Smith, 2019). En pratique, une sonde est utilisée pour transmettre des ondes de 20 à 40 kHz dans l'eau (Albright *et al.*, 2007). Ce procédé provoque un phénomène de cavitation ce qui signifie la formation de bulles de vapeur sous basses pressions et leur éclatement. L'éclatement de ces bulles dans la solution crée des conditions extrêmes dans lesquelles les cellules sont détruites (Albright *et al.*, 2007).

Cette méthode pourrait être applicable afin de réduire les populations d'Oomycètes tel *Pythium* en ayant un moindre impact sur les populations de bactéries bénéfiques. En effet, il a été constaté qu'un traitement par sonication inactivait les zoospores de *Pythium* tandis que 75% des cellules de *Pseudomonas* restaient viables. Ce phénomène s'explique par le fait que les

zoospores de *Pythium* sont plus larges que les cellules de bactéries et sont de ce fait plus sensibles à la sonication (Tu, J. C., Zhang, 2000).

## 4.2. Désinfection chimique

Certaines méthodes employant des moyens chimiques sont disponibles et ont déjà été testées pour l'aquaculture et des systèmes hydroponiques en vue d'améliorer la qualité de l'eau et de réduire les populations d'agents pathogènes. Cependant, ces méthodes : l'utilisation de surfactants, la chloration et l'ozonation, peuvent avoir des impacts négatifs sur la santé des poissons et des plantes. Quand ces méthodes sont utilisées, un système permettant de pomper l'eau dans une cuve séparée afin de la traiter et d'en retirer les composés toxiques est nécessaire (Hong and Moorman, 2005; Mori and Smith, 2019).

### 4.2.1. Surfactant

L'utilisation de surfactants non-ionique présente une bonne efficacité lorsque la source principale de propagation de maladies est les zoospores d'Oomycètes tels *Pythium*, *Phytophthora* et *Olpidium* (Schnitzler, 2004). Les surfactants provoquent la perte de mobilité et la lyse des zoospores tandis qu'à plus haute concentration, ils peuvent également inhiber totalement la formation de zoospores et de vésicules (Stanghellini and Tomlinson, 1987). En effet, les surfactants permettent de tuer rapidement les structures cellulaires sans paroi cellulaire, rendant les zoospores et vésicules plus sensibles à ce traitement (Stanghellini *et al.*, 1996). Par conséquent, les autres stades de développement tels le mycélium et les zoospores enkystés ne sont pas affectés par les surfactants (Stanghellini and Tomlinson, 1987).

### 4.2.2. Chloration

Le chlore peut être ajouté de différentes manières telles que des granulés, injection gazeuse et par électrolyse de chlorure de sodium (Hong and Moorman, 2005). Le chlore agit sur les cellules en pénétrant dans celles-ci et en réagissant avec les composés intracellulaires sans réaliser de dommages significatifs en surface ou affecter la perméabilité membranaire (Cho *et al.*, 2010). L'efficacité de cette méthode est influencée par le pH de l'eau, la teneur en composés organiques et inorganiques, la charge microbienne dans l'eau ainsi que le stade de vie de l'agent pathogène. Cependant, les concentrations nécessaires afin d'éliminer les agents pathogènes de plantes sont connues comme pouvant être toxiques pour les plantes et les poissons (Zillich, 1972; Hong and Moorman, 2005). Comme pour les surfactants, chaque stade de vie n'a pas la même sensibilité au chlore. En effet, les kystes et les zoospores s'avèrent être plus sensibles que les sporanges, hyphes, conidies et mycéliums (Cayanan *et al.*, 2009).

### 4.2.3. Ozonation

L'ozone (O<sub>3</sub>) est un agent oxydant puissant qui réagit lorsqu'il entre en contact avec la matière organique. Selon le temps d'exposition et la concentration en ozone, cette méthode est capable de tuer tous les organismes présents dans l'eau notamment grâce à l'altération de la perméabilité de la membrane cellulaire (Arana *et al.*, 1999; Postma, Van Os and Bonants, 2008).

Contrairement à la chloration, l’ozone ne pénètre pas dans la cellule et n’effectue des dommages qu’en surface (Cho *et al.*, 2010).

L’ozone est produit à partir d’air sec et d’électricité et utilisant un générateur d’ozone, provoquant la réaction suivante :  $3O_2 \rightarrow 2O_3$ . L’air enrichi en ozone est alors injecté dans l’eau (Postma, Van Os and Bonants, 2008).

Cependant, l’ozone réagit également avec les chélates de fer, provoquant sa précipitation et son dépôt dans le système d’irrigation. Le fer est rendu non disponible pour la plante et de plus hauts dosages sont nécessaires (Postma, Van Os and Bonants, 2008). Par ailleurs, en présence de certains composés tels que le brome ( $Br^-$ ), l’ozonation entraîne la formation de sous-produits qui pourraient avoir des effets toxiques (Wu *et al.*, 2019).

### **4.3. Contrôle biologique**

Le contrôle biologique a été défini par Cook et Baker (1983) comme étant la réduction de la quantité d’inoculum ou de l’activité d’un agent pathogène induisant une maladie, cela est accompli par un ou plusieurs organismes autres que l’homme. Les organismes employés dans ce contrôle biologique et ayant une activité de suppression sur l’agent pathogène sont nommés par le terme d’agent de contrôle biologique (Pal and McSpedden Gardener, 2006). Il peut être considéré que l’intérêt croissant porté à la lutte biologique a été animé par la préoccupation du public quant à l’utilisation de produits chimiques dans l’environnement et le besoin d’y trouver une alternative afin de lutter contre les maladies (Whipps, 2001). Dans le cadre des systèmes de culture hors-sol, ces organismes antagonistes sont principalement des bactéries, champignons et virus ayant des effets antagonistes sur les agents pathogènes des plantes. Les bactéries les plus représentées sont les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Paulitz, 1997; Whipps, 2001). Cependant, malgré les possibilités qu’offrent ces organismes, peu de développements de produits ont été effectués et des efforts doivent encore être fournis en ce sens (Postma, Van Os and Bonants, 2008; Stouvenakers *et al.*, 2019).

En théorie, la lutte biologique devrait s’avérer être plus efficace en aquaponie que dans les systèmes d’agriculture conventionnelle étant donné la plus faible diversité de microorganismes dans les systèmes de culture hors-sol. Il a été suggéré qu’il serait plus simple d’installer les conditions environnementales propices au développement de microorganismes bénéfiques pour le système aquaponique (Koohakan *et al.*, 2004). Il est néanmoins nécessaire que ces microorganismes soient très bien adaptés aux conditions environnementales. Qui plus est, l’introduction d’agents de biocontrôle en concentration suffisante est plus simple dans les systèmes de culture hors-sol que dans une culture en champs parce que l’accès au volume environnant la racine, l’eau, est plus simple. De même, introduire des agents de lutte biologique dans un système avec un microbiote encore déséquilibrée, par exemple en début de fonctionnement ou après une désinfection du système de culture, est a priori plus simple que dans un système avec une forte compétition où des microorganismes sont déjà établis comme dans le sol (Paulitz, 1997; Postma, Van Os and Bonants, 2008).

Vallance *et al.* (2011) a réalisé un compte-rendu dans lequel il fait état des éléments qui laissent à penser que les bactéries indigènes des systèmes de cultures hors-sol tel l’aquaponie pourraient

avoir un effet suppressif contre certaines maladies. L'effet suppressif a été défini dans le cas de l'hydroponie par (Postma, Van Os and Bonants, 2008) comme les cas où (i) l'agent pathogène ne s'établit ou ne persiste pas ou (ii) s'établit mais cause peu ou pas de dommages. Bien que cet effet suppressif puisse être exercé par des facteurs abiotiques de l'environnement, il est dans la plupart des cas dû à la présence de microorganismes ou de composés d'origine microbienne (James and Becker, 2007; Expósito *et al.*, 2017).

Tout d'abord, le rôle du microbiote naturel dans la suppression de certaines maladies a été étudié en comparant les systèmes de cultures avec et sans leur microbiote, après désinfection du système, et il a été mis en évidence que ce microbiote naturel pouvait avoir un effet suppressif sur ces maladies. Qui plus est, une haute densité de bactéries dans la rhizosphère peut également limiter une attaque d'agent pathogène sur les racines. En aquaponie, il peut être considéré que le mécanisme de recyclage des nutriments provenant de l'unité d'aquaculture peut également être une méthode préventive de contrôle d'agents pathogènes de plantes grâce à sa richesse en microorganismes qui pourraient ainsi jouer un rôle de lutte contre les agents phytopathogènes, notamment par la présence de microorganismes non pathogènes occupant la même niche écologique que les agents pathogènes (Gravel *et al.*, 2015). Une hypothèse a été formulée quant à l'implication de ce microbiote indigène sur la biosuppression de maladies (Stouvenakers *et al.*, 2019).

Ces agents de lutte biologique peuvent exprimer une large gamme d'activités différentes selon la manière avec laquelle ils interagissent avec la plante ou les agents pathogènes (Pal and McSpedden Gardener, 2006). Dans cette partie, il sera plus principalement abordé les modes d'actions employés par les agents de lutte biologique plutôt qu'une analyse détaillée de certains agents de biocontrôle. Différents modes d'actions pouvant induire un effet antagoniste seront abordés : l'antibiose, le parasitisme, la compétition pour les ressources et l'induction de mécanismes de résistance chez la plante (Whipps, 2001; Postma, Van Os and Bonants, 2008). Cependant, un organisme peut dans certaines situations utiliser plusieurs modes d'actions antagonistes, il est ainsi parfois difficile de catégoriser un individu comme utilisant spécifiquement un mode d'action.

#### 4.3.1. Antibiose

L'antibiose est un moyen d'antagonisme réalisé par l'intermédiaire de métabolites, spécifiques ou non, d'origine microbienne, incluant les agents lytiques, les enzymes, les composés volatiles et les autres substances toxiques (Jackson, 1965). Ces composés dits antibiotiques sont délétères pour la croissance d'autres microorganismes ou affectent leurs activités métaboliques (Thomashow and Bakker, 2015). Cependant, il reste important de ne pas sélectionner un organisme antagoniste uniquement parce qu'il démontre des comportements antagonistes dans des cultures artificielles. En effet, ces organismes doivent aussi posséder des compétences dans l'environnement dans lequel ils seront appliqués, telle la rhizosphère, et d'y produire des métabolites dans des conditions naturelles (Jarvis, 1992; Thomashow and Bakker, 2015).

De manière générales, deux genres bactériens, *Pseudomonas* et *Bacillus*, sont les plus étudiés comme étant des agents de biocontrôle produisant des composés antibiotiques. *Bacillus* spp. est le plus communément commercialisés grâce à sa formulation plus aisée sous forme de spores



(Whipps, 2001; Thomashow and Bakker, 2015). Le genre *Bacillus*, produit des lipopeptides cycliques qui sont directement impliqués dans des mécanismes d'antibiose contre des agents pathogènes du sol et des champignons phytopathogènes incluant des genres tels que *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Penicillium* et *Aspergillus* (Raaijmakers *et al.*, 2010). *Pseudomonas spp.* produit également des lipopeptides dont beaucoup peuvent avoir un impact significatif sur des Oomycètes tels *Phytophthora* et *Pythium spp.* mais aussi sur des bactéries telles que *Rhizoctonia* (Yang *et al.*, 2013)(Thomashow and Bakker, 2015).

Dès lors, grâce à l'action curative possible des antibiotiques et de leur large spectre d'action, notamment contre les champignons, ces organismes peuvent être utilisés en tant que moyen efficace de lutte biologique contre les agents phytopathogènes (Jijakli, 2003). Cependant, l'utilisation de composés antibiotiques peut également induire une résistance chez l'agent pathogène ciblé (Jijakli, 2003).

#### 4.3.2. Parasitisme

Le parasitisme peut être défini comme étant une relation dans laquelle deux organismes non phylogénétiquement liés coexistent sur une durée de temps prolongée. L'un des organismes, le parasite, en tirant des bénéfices et l'autre, l'hôte, qui subit des dommages mesurables (Pal and McSpedden Gardener, 2006). D'un point de vue de biocontrôle, on parle plus souvent d'hyperparasitisme lorsqu'un agent de lutte biologique parasite un agent phytopathogène, cette attaque menant à la mort de l'agent pathogène ou à celle de ses propagules (Pal and McSpedden Gardener, 2006)

Dans l'hyperparasitisme, on distingue principalement trois classes : (i) les holoparasites, où ces derniers ne peuvent compléter leur cycle de vie sans exploiter l'hôte approprié, (ii) les hypovirus, qui entraînent une hypovirulence et donc la réduction de la capacité de l'agent pathogène à induire une maladie et (iii) les parasites facultatifs, qui ne sont pas obligés de réaliser d'action parasitaire pour compléter leur cycle de vie.

Les bactéries, et plus particulièrement les actinomycètes, sont capables de parasiter et de dégrader les spores de champignons pathogènes de plantes. Cette relation peut s'étendre du simple attachement de la bactérie à l'agent pathogène avec un passage des nutriments de ce dernier à la bactérie, où la croissance de l'agent pathogène est inhibée, à une lyse complète et une dégradation de l'hyphe suite à la production d'enzymes dégradant les parois cellulaires (Whipps, 2001).

#### 4.3.3. Compétition pour les ressources

La compétition pour les ressources a généralement lieu pour deux ressources : les nutriments et l'espace. Cette compétition a lieu lorsque plusieurs microorganismes consomment simultanément le même composé (Jijakli, 2003). Un agent antagoniste efficace présentera des qualités essentielles telles qu'une colonisation rapide de l'environnement à protéger ainsi qu'une utilisation rapide et efficace des nutriments même si ces derniers sont présents en faibles quantités dans son environnement, cela pouvant résulter en une inhibition de la croissance de l'agent pathogène (Jijakli, 2003). Les bactéries et levures présentent un avantage certain sur les

tubes germinatifs des champignons car possédant un rapport surface-volume plus élevé (Jijakli, 2003).

Parmi les compétitions pour les nutriments, une des plus étudiées est la compétition pour le fer (Whipps, 2001; Jijakli, 2003). Lors de conditions de carence en fer, les bactéries sont capables de produire une variété de composés, des sidérophores, ayant une haute affinité avec le fer et capables de chélater ce dernier (Whipps, 2001). Les sidérophores sont des « molécules de faible poids moléculaire chélatrices du  $\text{Fe}^{3+}$  et servant de transporteur de l'ion ferrique à l'intérieur de la cellule » (Jijakli, 2003). Par ce phénomène, le peu de fer qui était présent dans la rhizosphère devient indisponible pour les champignons pathogènes présents, limitant ainsi leur développement. Par exemple, il a été illustré que le sidérophore pyoverdine produits par plusieurs espèces de *Pseudomonas* avaient un rôle dans le contrôle d'espèces de *Pythium* et de *Fusarium* (Whipps, 2001).

#### 4.3.4. Induction de résistance chez la plante-hôte

La plante peut développer une résistance à la suite d'une infection par un agent pathogène, en réponse à un insecte herbivore, en réponse à un traitement chimique spécifique mais aussi par la colonisation des racines par des microorganismes. Cette induction de résistance est caractérisée par l'activation de mécanismes de défense latents qui seront exprimés si un contact avec un agent pathogène a lieu à nouveau. On parle aussi de résistance systémique induite car la résistance n'est pas seulement effective à l'endroit du premier contact mais aussi dans les autres parties de la plante (Pieterse *et al.*, 2014).

L'avantage de l'utilisation d'organismes pour induire cette résistance systémique chez la plante est qu'aucun symptôme visible n'est causé à la plante hôte (van Loon, Bakker and Pieterse, 1998). Si cette résistance est induite à l'aide de composés microbiens qui induiront une résistance contre l'agent pathogène, ces composés sont plus généralement appelés éliciteurs (Lepoivre, 2003).

Il a également été mis en évidence que des sidérophores, molécules impliquées dans la compétition pour le fer, sont aussi impliquées en tant qu'éliciteurs efficaces de la résistance systémique induite (Thomashow and Bakker, 2015). Par exemple, les *Pseudomonas* produisent deux sidérophores, la pyocheline et l'acide salicylique, qui pourraient ainsi agir en tant qu'éliciteurs dans le cas de certaines plantes (Whipps, 2001). Dès lors, il est difficile d'établir si l'activité de biocontrôle de l'agent de lutte biologique est dû à la compétition pour le fer, à l'induction de résistance systémique, ou aux deux (Thomashow and Bakker, 2015).

## 5. Effet suppressif contre *Pythium aphanidermatum* en aquaponie

En aquaponie, très peu d'informations sont disponibles quant à une capacité du microbiote aquaponique d'offrir une possible protection à la plante. Malgré cela, en considérant les avancées déjà réalisées à ce sujet en hydroponie et en aquaculture recirculée, il est envisageable que cet effet soit également présent en aquaponie (reviewé par Stouvenakers *et al.*, 2019). De fait, l'effet suppressif dans les cultures hors-sol a déjà été reviewé par Postma *et al.* (2008) et Vallance *et al.* (2010) mais ces derniers n'ont pas clairement identifié les organismes impliqués

dans cette action suppressive. L'implication de cet effet suppressif était généralement évaluée par une élimination du microbiote, désinfection du système qui était ensuite réinoculé. Il a également été suggéré que la recirculation de l'eau pourrait permettre un meilleur développement ainsi qu'une meilleure dispersion des microorganismes bénéfiques impliqués dans l'effet suppressif par rapport à des systèmes ouverts sans recirculation (reviewé par Stouvenakers *et al.*, 2019).

Par ailleurs, un effet suppressif contre les agents phytopathogènes a aussi été observé dans le sol (Weller *et al.*, 2002; Latz *et al.*, 2016) et en compost (Antoniou *et al.*, 2017; Milinković *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Il a ainsi été suggéré que la présence simultanée de plusieurs genres bactériens tels que *Actinomyces*, *Bacillus* et *Pseudomonas* permettrait d'augmenter fortement la capacité suppressive d'un sol (Latz *et al.*, 2016). De même, des genres pouvant avoir des activités antagonistes tels *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* ont été identifiés en compost (Antoniou *et al.*, 2017).

Cependant, il peut également être suggéré que cet effet suppressif soit affecté par un autre facteur, la matière organique. Cette matière organique pourrait ainsi conduire à un écosystème microbien plus équilibré incluant la présence d'organismes antagonistes et qui serait ainsi moins propice au développement d'agents phytopathogènes (reviewé par Stouvenakers *et al.*, 2019). Cela ayant déjà été constaté dans le sol et en compost étant donné qu'un effet suppressif peut y être amélioré suite à l'ajout de matière organique, tels les acides humiques ou fulviques (Weller *et al.*, 2002; Milinković *et al.*, 2019).

Par conséquent, si l'effet suppressif a été constaté en hydroponie et en aquaculture recirculée, ainsi qu'en sol et en compost, étant des environnements très riches en matières organiques, il est possible de formuler une hypothèse. Celle-ci supposerait que l'aquaponie, étant un système à eau recirculée et un environnement riche en matière organique, devrait présenter un consortium de microorganismes pouvant exercer une action suppressive contre des agents pathogènes tel *P. aphanidermatum*.

## **6. Séquençage haut-débit et caractérisation de communautés microbiennes**

Depuis longtemps, les technologies développées par les scientifiques pour l'étude de la microbiologie environnementale étaient limitées aux techniques microscopiques et de culture (Deutschbauer, Chivian and Arkin, 2006). Cependant, un frein majeur à ces techniques est qu'il n'est pas toujours possible de détecter, avec des méthodes dépendantes de mises en cultures, les organismes souhaités car ceux-ci nécessitent des conditions de croissance qui ne peuvent facilement être reproduites en laboratoire (Lagier *et al.*, 2015). En effet, seule une très faible proportion de microorganismes sont actuellement capables d'être isolés ou cultivés dans des conditions standards de laboratoire (Deutschbauer, Chivian and Arkin, 2006; Cruaud *et al.*, 2014). C'est pour cela que des alternatives se sont développées et permettent de séquencer certaines régions du matériel génétique afin de pouvoir en analyser les séquences ultérieurement, le séquençage haut-débit ou séquençage de nouvelle génération (Metzker, 2010).

Le séquençage haut-débit offre de nouvelles opportunités et particulièrement celle d'analyser tous les microorganismes présents dans un échantillon et d'en dresser le profil sa population, cela est appelé la métagénomique. Plus rigoureusement, la métagénomique correspond au séquençage non ciblé de tous les génomes microbiens présents dans un échantillon (Quince *et al.*, 2017). Cette technologie est particulièrement importante dans le cadre de l'aquaponie et plus particulièrement dans l'étude des interactions entre les populations microbiennes et leur environnement (Munguia-Fragozo *et al.*, 2015). Grâce à ces nouvelles technologies, il est possible d'évaluer le potentiel des communautés microbiennes en aquaponie pour de futures utilisation biotechnologiques (Munguia-Fragozo *et al.*, 2015).

Cependant, il reste important de tenir compte du fait que la caractérisation de communautés microbiennes grâce au séquençage haut-débit implique également des biais, notamment à travers chaque étape réalisée telles l'extraction ADN, l'amplification PCR ou encore l'analyse de données qui peuvent modifier la composition des échantillons analysés (Cruaud *et al.*, 2014).

Finalement, une étape d'amplification par PCR d'un fragment du génome est nécessaire pour la majorité des méthodes de séquençage et cette dernière est très importante. En effet, il est important de choisir la bonne région à amplifier afin de pouvoir caractériser l'ensemble de la population microbienne (Cruaud *et al.*, 2014). De manière générale, la caractéristique recherchée pour ces régions est une alternance des régions conservées et hypervariables, la présence des régions conservées permettant le design d'amorces dites universelles car elles sont supposées pouvoir s'hybrider à des organismes encore inconnus (Cruaud *et al.*, 2014). Cependant, selon les organismes que l'on souhaite identifier, les régions à amplifier ne sont pas toujours les mêmes (Voir partie 6.1. Régions étudiées).

## **6.1. Régions étudiées**

### **6.1.1. ARN ribosomal 16S**

La caractérisation de communautés bactériennes est très largement réalisée grâce au séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S (Yang, Wang and Qian, 2016). Cette région est composée de neuf régions hypervariables nommées V1-V9 alternant des zones hautement conservées et hypervariables mais, étant donné par la longueur limitée de séquençage des technologies HTS, seulement une partie de l'ARNr 16S est séquencé (Munguia-Fragozo *et al.*, 2015; Yang, Wang and Qian, 2016). Pour la caractérisation de communautés bactériennes complexes, bien qu'aucune région hypervariable seule ne soit capable de distinguer toutes les bactéries, les régions hypervariables V2, V3 et V6 présentent le plus d'hétérogénéité et sont ainsi capables de présenter un haut pouvoir discriminant (Chakravorty *et al.*, 2007). Ainsi, plusieurs jeux d'amorces ont été désignés et dans le cas de l'aquaponie, on retrouve notamment Schmutz *et al.* (2017) et Eck *et al.* (2019) qui ont utilisé les amorces 27F et 534R (région V1-V3) afin d'en caractériser les populations bactériennes dans différents compartiments.

### **6.1.2. Internal Transcribed Spacer**

Pour la caractérisation de population de champignons, l'*Internal Transcribed Spacer* (ITS) est généralement utilisé (Schoch *et al.*, 2012; Toju *et al.*, 2012). Ce marqueur universel pour les

champignons consiste en deux zones hypervariables (ITS1 et ITS2) comprises entre la petite sous-unité d'ARNr 18S et la grande sous-unité d'ARNr 28S, et séparées par la région d'ARNr 5,8S (Figure 4).

Ces régions ont en effet été démontrées comme possédant la plus haute probabilité d'identification correcte parmi deux autres régions, l'ARN ribosomique 28S et l'ARN ribosomique 18S (Schoch *et al.*, 2012). Cependant, l'identification d'organismes jusqu'au niveau de l'espèce n'est pas possible avec un seul marqueur génétique. Qui plus est, l'ITS ne permettrait pas la réalisation d'analyses phylogénétiques (Schoch *et al.*, 2012).

La Figure 4 recense plusieurs combinaisons d'amorces qui sont utilisées pour la caractérisation de communautés de champignons dans des environnements très divers (Toju *et al.*, 2012). Pour l'instant, aucune analyse métagénomique des communautés fongiques n'a encore été effectuée dans un système aquaponique, il est ainsi difficile de statuer sur l'utilisation préférentielle de certaines amorces.

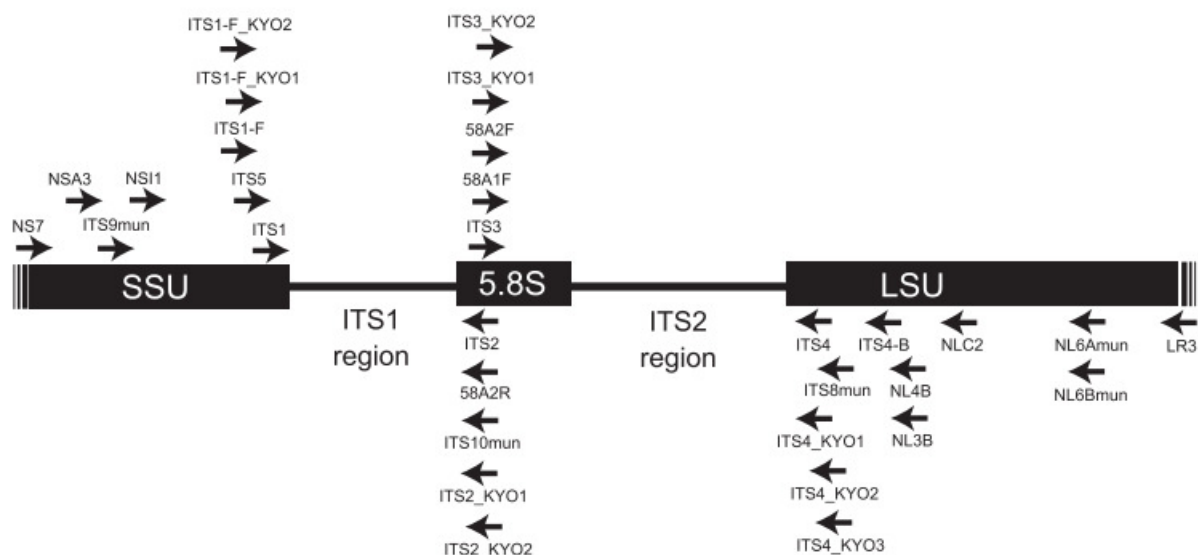


Figure 4: Carte de gènes de d'ARN ribosomiques et de leurs régions ITS. Les amorces *forward* (flèche vers la droite) et *reverse* (flèche vers la gauche) permettant l'amplification de ces régions sont représentées (Toju *et al.*, 2012).

## 6.2. Analyse bioinformatique

L'analyse bioinformatique de données de séquençage issues de communautés microbiennes est souvent réalisée à l'aide de plateforme QIIME, bien qu'il en existe d'autres. QIIME (*Quantitative Insight Into Microbial Ecology*, trad Aperçu quantitatif de l'écologie microbienne) est un logiciel développé depuis 2010 qui permet l'analyse de communautés microbiennes. En effet, les quantités d'informations générées par le séquençage haut-débit étant très importantes, un logiciel permettant de les traiter efficacement est nécessaire. Ce logiciel permet le traitement de ces données et plus particulièrement l'analyse des communautés microbiennes ainsi que leur visualisation sous forme de figures et graphiques (Caporaso, Kuczynski, *et al.*, 2010). Cette analyse se réalise généralement par une succession de scripts exécutés par l'utilisateur et un plan de travail à partir de données brutes jusqu'à l'analyse des

taxons et des diversités  $\alpha$  et  $\beta$  a été dressé par Lawley et Tannock (2017). Ici, un intérêt particulier a été porté sur la comparaison des méthodes d'assignation taxonomique.

### 6.2.1. Méthodes d'assignation taxonomique

L'étape d'assignation taxonomique est une des plus cruciales et QIIME propose plusieurs méthodes dont UCLUST, sa méthode par défaut, le RDP classifier et BLAST (Wang *et al.*, 2007; Camacho *et al.*, 2009; Edgar, 2010; Almeida *et al.*, 2018). Ces méthodes influencent l'analyse bioinformatique par la précision des algorithmes de classification qu'elles utilisent (Almeida *et al.*, 2018).

La méthode UCLUST est la méthode par défaut proposée par QIIME 1. UCLUST est un algorithme de *clustering* de séquences qui emploie la méthode USEARCH afin d'assigner des séquences aux clusters. Cette méthode fonctionne en classant les séquences de la base de données selon le nombre de « mots » qu'elles ont en commun avec la séquence d'intérêt de manière décroissante. Ainsi, cela permet de dire que (i) si un *hit* existe dans la base de données, il devrait se trouver parmi les premiers candidats et (ii) la probabilité que ce *hit* existe diminue au fur et à mesure que le nombre de tentative infructueuses augmente. Cela permet d'analyser uniquement les premiers candidats sans perte importante de sensibilité (Edgar, 2010).

BLAST est un des outils les plus populaires en bioinformatique. Cette méthode, en plus de réaliser des alignements de séquences d'intérêts sur des bases de données, fournit une valeur « attendue », la e-value, qui est une information statistique sur la signification de chaque alignement. Ainsi, l'utilisation du BLASTn ou du MEGABLAST permet de comparer des séquences nucléotidiques à une base de données aussi composées de nucléotides (Camacho *et al.*, 2009).

La méthode RDP est quant à elle basée sur la classification naïve bayésienne qui est un modèle probabilistique simple qui calcule une série de probabilités sur base des fréquences et des combinaisons de valeurs dans le jeu de données. De même, cela est basé sur le théorème de Bayes et suppose que tous les attributs sont indépendants (Patil and Sherekar, 2013). L'avantage de cette méthode est qu'en plus de fournir le meilleur match d'assignation taxonomique, elle offre également un score de confiance par rapport à l'assignation réalisée (Lan *et al.*, 2012).

Différentes études ont déjà réalisé des comparaisons de ces méthodes d'assignation taxonomiques grâce à l'utilisation de *mock communities*. Bokulich *et al.* (2018) ont comparé ces trois méthodes et ont mis en évidence que UCLUST présentait la précision la plus faible tandis que RDP était la méthode la plus efficace en termes d'assignation taxonomique à la fois pour des données issues d'ARNr 16S ou d'ITS.

#### a. Intérêt des *mock communities*

Dans ce genre d'études, les *mock communities* sont généralement utilisées car elles sont composées de mélanges de cellules microbiennes ou d'ADN à des ratios connus (Bokulich *et al.*, 2016). Celles-ci permettent de pointer trois types de contrôles de la qualité dans les expériences de métagénomique : (i) monitorer l'effet de batch de différents cycles de traitement des échantillons, (ii) évaluer les variations induites par le choix des protocoles de traitement des

échantillons et (iii) étudier les différences entre les observations et la composition actuelle de la communauté (Brooks *et al.*, 2015).

Dans le cas de l'utilisation de *mock communities* pour l'évaluation de méthodes d'assignation taxonomiques, trois indices sont généralement utilisés, la précision, le rappel et la F-mesure, nécessitant de connaître au préalable la classification de chaque séquence, l'utilisation de *mock communities* (Bokulich *et al.*, 2018). Le rappel, aussi appelé, sensibilité, est la proportion de vrais positifs correctement prédits positifs (Powers, 2011). En d'autres mots, il s'agit du nombre d'objets prédits positifs par rapport à l'ensemble de tous les éléments positifs. Tandis que la précision ou la confiance représente la proportion d'objets prédits positifs qui sont correctement de vrais positifs (Powers, 2011). Il s'agit alors de la proportion de vrais positifs par rapport à la somme de ces vrais positifs et des faux positifs.

Cependant, lorsque l'on cherche à améliorer un de ces indices, l'autre est généralement déprécié (Bokulich *et al.*, 2018). Une mesure plus harmonique est ainsi utilisée, la F-mesure, les combinant de la manière suivante :  $F - measure = \frac{2 * precision * rappel}{precision + rappel}$ . Cette mesure reflète plus globalement l'efficacité d'une méthode (Powers, 2011).

### 6.3. Etude de la diversité

Après l'assignation taxonomique, la diversité  $\alpha$  et  $\beta$  des communautés bactériennes est généralement étudiée.

#### 6.3.1. Diversité $\alpha$

La diversité alpha correspondant en la mesure de la diversité au sein d'une communauté ou d'un échantillon. Cette mesure peut soit être mesurée de manière simple à travers le nombre d'espèces observées, ou d'OTUs (*Operational Taxonomic Unit*), correspondant ainsi en la richesse en espèces (Lawley and Tannock, 2017). Une autre mesure similaire est l'indice Chao1 qui estime le nombre d'espèces présentes dans l'échantillon sur base du nombre d'OTUs observés et du nombre de singletons (OTU composé d'une séquence) et de doubletons (OTU composé de deux séquences), Chao1 fournit ainsi une estimation sur des espèces non détectées et est en théorie plus importante que le nombre d'OTUs observés (Chao and Chiu, 2016).

L'indice de Shannon peut également être mesuré et correspond à une mesure de la diversité des espèces. Il consiste en la mesure de la quantité d'information inversement proportionnelle à la probabilité d'occurrence de cette observation. Ainsi, cet indice porte plus d'importance aux individus rares qu'aux individus communs (Marcon, 2018).

#### 6.3.2. Diversité $\beta$

L'analyse de la diversité beta permet un aperçu qualitatif des différences entre plusieurs communautés, il est ainsi possible d'observer des différences entre des traitements différents. Cette diversité peut être estimée grâce à des mesures prenant compte de l'information phylogénétique ou non, ainsi qu'en prenant ou non compte des abondances relatives des individus (*weighted*, *unweighted*) (Lawley and Tannock, 2017). Par défaut, QIIME calcule les distances UniFrac *weighted* et *unweighted*, qui est une mesure prenant compte de la phylogénie

(Lozupone, Hamady and Knight, 2006; Lawley and Tannock, 2017). Il est cependant possible d'utiliser la mesure de dissimilarité Bray-Curtis lorsque la phylogénie n'est pas incluse dans l'analyse de la diversité beta, celle-ci semblant être plus généralement utilisée pour l'étude de communautés fongiques (Xu *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Koechli *et al.*, 2019).

### III. CONTEXTE ET OBJECTIFS

---

Deux répliques d'une expérience *in vivo* sur la laitue (Figure 5) ont été réalisés par Gilles Stouvenakers durant son doctorat et ont permis de démontrer l'effet suppressif d'une eau aquaponique contre l'agent pathogène *Pythium aphanidermatum*. Cependant, durant ces mêmes essais, l'effet suppressif observé sur la maladie racinaire avec de l'eau aquaponique n'a pas été rencontré avec de l'eau hydroponique ou de l'eau aquaponique complémentée. Dans ces mêmes expériences, des témoins sains, c'est-à-dire sans inoculation de l'agent pathogène ont également été mis en place. L'hypothèse émise pour expliquer l'effet suppressif rencontré avec l'eau aquaponique est celle de l'implication d'un microbiote bénéfique. Microbiote qui serait différent en hydroponie et perturbé dans le cas de l'aquaponie complémentée à la suite d'ajout de sels nutritifs et à la modification du pH dans le but d'atteindre les niveaux établis en hydroponie. C'est dans ce but qu'a été entrepris l'analyse de trois microbiotes racinaires des laitues ayant poussées durant les 2 expérimentations, c'est-à-dire la rhizosphère, la rhizoplane et l'endosphère. L'analyse a été réalisée par séquençage Illumina 16S et ITS sur les échantillons prélevés lors de ces expériences.

Cette expérimentation relève ainsi pour objectif principal de comparer le microbiote racinaire promu par les 3 conditions expérimentales et de mettre en évidence des organismes qui pourraient avoir un effet suppressif contre l'agent pathogène *Pythium aphanidermatum* en aquaponie. Des objectifs secondaires portant sur l'analyse bioinformatique ont aussi été posés et sont les suivants :

- Mettre en évidence une méthode d'assignation taxonomique qui présente les meilleures performances pour l'analyse de séquences 16S ou ITS1 issues du séquençage haut-débit.
- Evaluer l'effet de l'ajout de séquences rejetées par le logiciel d'analyse bioinformatique lors de l'appariement des séquences sur les résultats bioinformatiques





Figure 5 : Photos d'une des deux expériences *in vivo* réalisée par Gilles Stouvenakers. (Photos : Gilles Stouvenakers)

## IV. MATÉRIEL ET MÉTHODE

---

### 1. Manipulations en laboratoire

À la suite de l'expérimentation décrite dans la partie « Contexte et objectifs », des échantillons correspondants à différents microbiomes de la laitue avaient été récoltés et étaient disponibles pour les manipulations de ce travail. La manière dont ces échantillons ont été récoltés et conservés est décrite dans la partie suivante.

#### 1.1. Récolte et conservation du microbiote racinaire des laitues

Trois microbiomes ont été récoltés en fin d'expérimentation : la rhizosphère, la rhizoplane et l'endosphère.

Dans les expérimentations mises en place, la rhizosphère correspondait à l'eau directement influencée par les racines. Dans ce cas particulier où le système de culture était constitué d'un bac (L x l x H de 36,3cm x 42,5cm x 26,3cm) rempli de 20l d'eau correspondant au traitement (eau hydroponique (HP), aquaponique (AP) et aquaponique complémentée (AP+)). Un mouvement d'eau dans ces derniers était assuré par un bulleur actionné par une pompe à air fonctionnant toutes les 6 heures. La rhizosphère des 4 laitues soutenues par un radeau en polystyrène flottant, a été considérée comme étant l'entièreté des 20l d'eau contenus dans le bac. Par conséquent, 30ml d'eau de chaque bac de culture ont été échantillonnés à la fin de l'expérimentation, puis mélangés à 10ml de glycérol (VWR) autoclavé et conservés à -20 °C.

La rhizoplane a ensuite été récoltée par lavage des racines des laitues. Pour ce faire, 0,5g de racines de chacune des laitues ont été échantillonnés et ajoutés dans un tube à centrifugation de 50ml contenant 30ml de tampon stérile de phosphate de potassium + tween ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05M (Merck),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05M (Merck) et 0.05% de tween 80). Le tube à centrifugation a ensuite été plongé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes afin que le microbiote présent en surface

des racines, la rhizoplane, s'en détache et soit en suspension. Les racines ont été retirées du tube à centrifugation et le tampon phosphate contenant la rhizoplane a été mélangé à 10ml de glycérol autoclavé et conservé à -20 °C.

Les racines utilisées pour la récupération du microbiote de la rhizoplane ont ensuite été désinfectées en les immergeant pendant une minute dans de l'alcool (Merck), trois minutes dans de l'hypochloride de sodium (3,78%, VWR) et trois fois trois minutes dans de l'eau distillée stérile. Les racines maintenant désinfectées en surface mais contenant encore le microbiote de l'endosphère dans ses tissus ont été conservées à -80 °C après une congélation flash à l'azote liquide.

## **1.2. Récupération des différents microbiotes racinaires**

Les échantillons de rhizoplane et de rhizosphère étant composés de tampon phosphate avec du glycérol à 25%, la même méthode de récupération du microbiote a été utilisée. Une autre méthode de récupération sera utilisée pour la racine contenant l'endosphère.

Afin de récupérer le microbiote de la rhizoplane et de la rhizosphère, les échantillons sont d'abord décongelés et filtrés grossièrement sur une étamine stérile afin d'enlever les débris de racines et autres impuretés. Ces eaux ont ensuite été filtrées sous vide par passage sur filtre de 0,2µm (PALL Life Science super - 200, 47mm diamètre). Le filtre contenant dès lors le microbiote a été récupéré et découpé en petits morceaux à l'aide de ciseaux désinfectés. Ces morceaux ont alors été conservés au frigo jusqu'à l'extraction ADN réalisée la même journée.

Pour la récupération du microbiote de l'endosphère, les racines décongelées ont été placées stérilement dans un *mesh bag* (12cm\*12,5cm, Agdia Biofords). Un tampon de broyage de phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05M,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05M) contenant 0,05% de tween 80 et ajusté à pH de 6,5 a été ajouté selon le rapport solide/liquide de 1/9. Les échantillons de racine ont été broyés dans leurs *mesh bags* par pression et rotation à l'aide d'une foreuse (PowerPlus X0270, 850W) équipée d'un disque rotatif lisse. Le jus en résultant a été récupéré en prélevant le minimum de débris racinaire et a été transféré dans un tube à centrifugation stérile de 15ml. Cette solution a été filtrée grossièrement sur étamine dans un tube à centrifugation stérile de 50ml puis conservée à -20°C avec 25% de glycérol avant l'extraction ADN.

## **1.3. Cultures pures de *Pseudomonas chlororaphis***

Afin de servir de témoin pour indiquer d'éventuelles contamination et vérifier la bonne détection des organismes lors de l'analyse bioinformatique, une culture pure de *Pseudomonas chlororaphis* TX-1 (ATCC 55670) a été réalisée. Ainsi, pour chaque type de microbiome extrait, un échantillon de culture pure sera également extrait.

La souche a tout d'abord été inoculée dans le milieu de culture TSB (tryptone soy broth). Après une incubation de 72h à 25°C, une centrifugation de 10 minutes à 3000g a été réalisée et le surnageant a été jeté. Afin de laver le culot, celui-ci a été resuspendu par vortex dans une solution stérile de sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ , Merck) 0.1M et a ensuite été centrifugé (Sigma 4-16KS) pendant 10 minutes à 3000g. Cette opération a été répétée deux fois afin d'éliminer toute trace de TSB. Finalement, le culot a été resuspendu dans une solution 0,1M de

MgSO<sub>4</sub>. Après lecture de l'absorbance de la suspension de *P. chlororaphis* au spectromètre et grâce à une courbe d'étalonnage, celle-ci a été diluée pour atteindre une concentration finale de 10<sup>4</sup> cfu/ml contenant 25% de glycérol.

#### **1.4. Extraction de l'ADN**

Une fois les microbiotes récupérés, il est possible d'en extraire l'ADN en vue d'une amplification par *polymerase chain reaction* (PCR).

L'extraction ADN est basée sur l'utilisation du FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals) et suivra le même protocole pour les trois microbiotes récupérés. Cependant, le début du protocole varie légèrement selon le microbiote extrait, comme expliqué ci-après.

Pour les échantillons d'endosphère, une centrifugation préalable à 2350g pendant 20 minutes à 20 °C a été réalisée afin de concentrer les cellules présentes dans l'échantillon. Après centrifugation, le surnageant est alors retiré du tube à raison du ¾ du volume total de l'échantillon.

L'extraction avec ce kit d'extraction débute par une étape de dégradation des cellules par action mécanique et chimique. Dépendant du type d'échantillon utilisé, 200µl de la solution concentrée de l'endosphère ou les filtres découpés de la rhizoplane et de la rhizosphère ont été ajoutés dans un tube contenant des petites billes de silice ainsi qu'une perle de céramique. Un ml d'un tampon de lyse du kit a ensuite été ajouté et le tube a été homogénéisé. L'ADN a alors été libéré en solution et l'échantillon a été centrifugé (Sigma 1-16K) à 14 000g pendant 10 minutes.

Après homogénéisation et centrifugation, le surnageant, contenant l'ADN, a été récupéré et mélangé à une suspension (*binding matrix*) afin de se lier aux molécules d'ADN. Après une courte incubation sous agitation à température ambiante, la solution a été centrifugée à deux reprises dans un *SPIN filter* afin d'isoler du reste de la solution la matrice solide contenant l'ADN.

La matrice a été resuspendue dans une solution de lavage et centrifugée à nouveau pour obtenir un culot purifié en ADN. Après l'ajout d'une solution déliant l'ADN de la matrice solide et une courte incubation à 55 °C, l'ADN est finalement élué.

La qualité et la concentration de l'ADN est ensuite évaluée à l'aide d'un Nanodrop (Nanodrop ND-1000 Spectrophotomètre, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Deux ratios d'absorbance ont été mesurés, 260/280 nm et 260/230 nm, l'ADN était considéré de bonne qualité et de pureté quand ces ratios étaient environ 1,8 pour 260/280 nm et entre 2,0 et 2,2 pour 260/230 nm. L'ADN est ensuite conservé à -20 °C. L'ADN est finalement conservé à -20 °C.

#### **1.5. Amplification PCR**

Après extraction, l'ADN purifié peut être amplifié par PCR. Comme expliqué dans l'introduction (voir partie ...), les bactéries et les champignons ont été analysées par le séquençage à haut débit de deux régions différentes, la région V1-V3 de l'ARN ribosomique

16S pour les bactéries et la région ITS1 pour les champignons. Deux paires d'amorces différentes sont par conséquent nécessaires.

Pour la région V1-V3 de l'ARN ribosomique 16S, les amorces sont celles utilisées dans la littérature (voir II.6.1.1 ARN ribosomal 16S) : l'amorce *Forward* V1-V3 27F (Eurogentec) (5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**AGAGTTTGATCCTGGCTCAG**-3') et l'amorce *Reverse* V1-V3 534R (Eurogentec) (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**ATTACCGCGGCTGCTGG**-3'), où la première partie représente les adaptateurs illumina et la partie en gras les amorces 16S V1-V3.

Pour l'ITS1, les amorces ont été choisies parmi celles utilisées dans la littérature (voir II.6.1.2 Internal Transcribed Spacer) : l'amorce *Forward* ITS1 KYO2 (Eurogentec) (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**TAGAGGAAGTAAAAGTCGTA**A-3') et l'amorce *Reverse* ITS1 KYO2 (Eurogentec) (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**TTYRCTRCGTTCTTCATC**-3'), où la première partie représente les adaptateurs illumina et la partie en gras les amorces ITS1.

La réaction d'amplification PCR a été réalisée avec le kit 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR (Kapa Biosystems). Des réactions de 25 µl ont été effectuées, dont 2,5 µl d'ADN, 5µl de chaque primer, concentrés à 1 µM, et 12,5 µl de 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR. Le programme PCR utilisé débute avec une phase de dénaturation de l'ADN de 5 min à 95 °C et avec 25, 30 ou 35 cycles de 30 sec à 95 °C, 30 sec à 55 °C et 30 sec à 72 °C. Vingt-cinq cycles ont été effectués pour toutes les amplifications relatives à l'ARNr 16S tandis que 30 cycles ont été effectuées pour les échantillons de rhizosphère et de rhizoplane et d'ITS1 et finalement 35 cycles pour les échantillons d'endosphère d'ITS1. Une phase d'extension de 5 min à 72 °C termine l'amplification PCR. Les produits PCR sont finalement conservés à 4 °C.

## 1.6. Séquençage haut-débit

Le séquençage a été réalisé par l'entreprise DNA Vision (Gosselies, Belgique). Au total, 225 échantillons ont été séquencés. Deux *runs* de séquençage ayant été réalisés à des moments différents.

### 1.6.1. Protocole de DNA Vision

Le protocole utilisé par DNA Vision a été spécialement développé et optimisé pour préparer des libraires d'amplicons à séquencer en utilisant le Miseq Illumina.

Tout d'abord, les produits PCR sont purifiés avec les billes AmpureXP pour éliminer les amorces et dimères d'amorces. Après la purification, les échantillons sont indexés. Dans ce cas, il s'agit d'un double indexage où chaque combinaison de deux index est propre à chaque amplicon. Cela est réalisé à l'aide des Nextera XT Index Primer 1 et 2 sur les échantillons d'ADN normalisés à 5ng/µl. Le tout est amplifié par PCR avec la 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems) selon le même protocole d'amplification à 25 cycles utilisé

précédemment. Avant leur quantification, les librairies sont purifiées avec les billes AmpureXP. Par après, la validation des librairies est réalisée avec le bioanalyzer DNA 1000 où la taille des amplicons est vérifiée. Ensuite, les librairies sont quantifiées avec le picrogreen avant d'être normalisées à 4nM. Après normalisation des librairies, elles sont poolées, dénaturées avec du NaOH et ensuite par la chaleur avant d'être chargées sur le Miseq Illumina. Finalement, les *reads* séquencés présentent une longueur de deux fois 250 nucléotides.

## **2. Analyse bioinformatique**

L'analyse bio-informatique des données de séquençage a été réalisée avec le logiciel QIIME 1.9.1 (Quantitative Insight Into Microbial Ecology) (Caporaso, Kuczynski, *et al.*, 2010).

Deux jeux de données différents ont été utilisés afin de répondre à des objectifs différents. En effet, des *mock communities* ont été utilisées afin de mettre en évidence une méthode d'assignation taxonomique plus performante tandis que les données issues du séquençage haut-débit ont été utilisées afin de caractériser les trois microbiotes récoltés. Dès lors, le plan de travail utilisé ne varie pas fondamentalement mais de petites nuances y sont apportées selon l'objectif recherché et les données utilisées.

### **2.1. Plan de travail**

La Figure 6 représente le plan de travail suivi pour les analyses bioinformatiques réalisées où chaque étape est développée dans les parties 2.1.1 Comparaison des méthodes d'assignation taxonomique et 2.1.2 Analyse des données des essais *in vivo*.

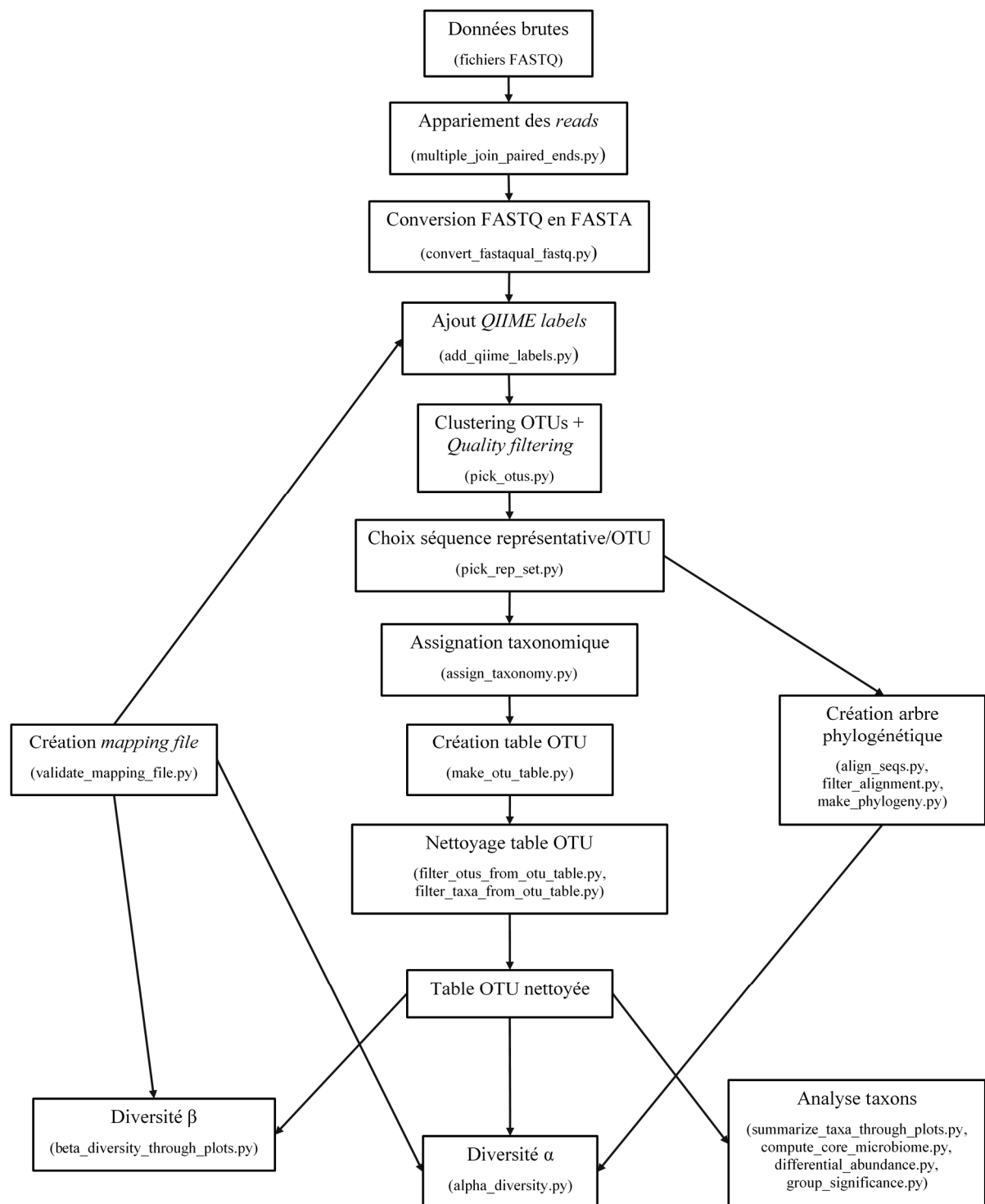


Figure 6: Plan de travail de l'analyse bioinformatique à partir de fichiers en format FASTQ réalisée sous QIIME 1.9.1

### 2.1.1. Comparaison des méthodes d'assignation taxonomique

La comparaison des trois méthodes d'assignation, Ribosomal Database Project, blast et uclust a été réalisée à l'aide du logiciel QIIME 1.9.1. Celle-ci se base sur l'analyse de *mock communities* pour l'ARN ribosomal 16S issues des ressources du projet mockrobiota

(<http://caporaso-lab.github.io/mockrobiota/>) (Bokulich *et al.*, 2016). La *mock community* 15 (Kozich *et al.*, 2013) a ainsi été utilisée pour les analyses suivantes.

#### a. Traitement des données brutes

Tout d'abord, les données des *mock communities* nécessitaient une préparation. En effet, les séquences *forward* et *reverse* sont contenues dans deux fichiers FASTQ différents pour chaque échantillon. Il est nécessaire de les fusionner avec le script suivant : `multiple_join_paired_ends.py`.

Ensuite, le script `convert_fastaqual_fastq.py` est utilisé afin de séparer les séquences des informations relatives à la qualité de l'échantillon.

Afin de permettre une identification complète de l'échantillon en fonction des paramètres expérimentaux, une *mapping file* a été créée. Le script `validate_mapping_file.py` permet d'assurer que la mapping file est correctement formatée et ne contient pas d'erreurs qui pourraient rendre la suite de l'analyse impossible.

Finalement, le script `add_qiime_labels.py` est utilisé afin d'ajouter l'identification encodée dans la *mapping file*, le *QIIME label*, à chaque échantillon. D'autre part, les fichiers FASTA sont fusionnés en un seul.

A la suite de ces opérations, les données sont sous le bon format et une analyse plus poussée est possible. La prochaine étape consiste à assigner des séquences similaires à un OTU (*Operational Taxonomic Unit*) sur base d'un seuil d'identité défini avec le script `pick_otus.py`. Cette opération est réalisée avec la méthode USEARCH (Edgar, 2010, version v5.2.236) et un taux d'identité minimal de 97%. Cette méthode permet ainsi de réaliser des *clusters* mais aussi de vérifier la présence de chimères et de réaliser un *quality filtering*. Ce dernier se réalise à l'aide de base de données 16S (SILVA, release 132).

Etant donné que chaque OTU est potentiellement composé de plusieurs séquences similaires mais légèrement différentes, il est nécessaire de choisir une séquence qui sera représentative de l'OTU. Le script `pick_rep_set.py` a donc été utilisé à cette fin.

Il est désormais possible d'assigner une taxonomie à chaque OTU grâce à une méthode et une base de données avec le script `assign_taxonomy.py`. La base de données SILVA (*release* 136) ainsi que trois méthodes différentes (RDP classifier (Wang *et al.*, 2007, version 2.2), blast (Altschup *et al.*, 1990, blastn et megablast) et UCLUST (Edgar, 2010)) ont ainsi été utilisées pour comparer les méthodes d'assignation taxonomique avec les paramètres par défaut de QIIME 1.9.1.

Une fois la taxonomie assignée, le script `make_otu_table.py` permet de générer une table reprenant le nombre d'occurrence de l'OTU dans chaque échantillon ainsi que sa prédiction taxonomique.

#### b. Analyse des *mock communities*

La répartition taxonomique va être analysée afin de calculer deux indices, le taux de précision de taxon (TPT) et le taux de détection de taxon (TDT), afin de mesurer l'efficacité de l'assignation taxonomique sur base des vrais positifs (VP), faux positifs (FP) et des faux négatifs (FN).

La répartition taxonomique a ainsi été générée à l'aide du script `summarize_taxa_through_plots.py`.

Finalement, ces deux indices ont été calculés à l'aide des formules suivantes :

- $TPT = VP / (VP + FP)$
- $TDT = VP / (VP + FN)$

Où TPT = taux de précision de taxon, TDT = taux de détection de taxon, VP = Vrai positif, FP = faux positif et FN = faux négatif.

## 2.1.2. Analyse des données des essais *in vivo*

### a. Traitement des données brutes

Le traitement des données brutes de séquençage haut-débit suit majoritairement la démarche utilisée lors du traitement des données brutes des *mock communities* (voir 2.1.1.a. Traitement des données brutes). Cependant quelques modifications y ont été apportées principalement dû au traitement de données d'ITS1 et aux résultats de la comparaison des méthodes d'assignation taxonomique.

- Le script `pick_otus.py` a été utilisé, en plus de la base de données SILVA pour l'ARNr 16S, avec la base de données ITS1 UNITE (version 24.09.12) pour les échantillons correspondants.
- L'assignation taxonomique a été réalisée avec les méthodes qui ont été mises en évidence comme présentant la meilleure assignation taxonomique (voir VI.1. Evaluation des méthodes d'assignation taxonomique).

Qui plus est, le plan de travail n'a pas été utilisé en entier pour la comparaison des méthodes d'assignation taxonomique car seule cette assignation était évaluée, les scripts décrits-ci dessous comprennent la suite du plan de travail décrit à la Figure 6.

Une fois la table OTU générée, celle-ci nécessite plusieurs nettoyages. En effet, il est recommandé de la filtrer des singletons, OTU observés une seule fois, mais aussi des séquences provenant des chloroplastes et des mitochondries grâce aux scripts suivants :

- `Filter_otus_from_otu_table.py` a été utilisé en précisant de rejeter les OTU observés moins de deux fois.
- `Filter_taxa_from_otu_table.py` permet de rejeter tous les OTU de la table OTU qui ont été assignés en tant que chloroplastes ou mitochondries.

En même temps que l'assignation taxonomique, il est possible de générer un arbre phylogénétique à l'aide d'une succession de scripts. Cet arbre sera utile pour certaines analyses basées sur la phylogénie. Comme expliqué dans l'introduction (II.6.1.2 Internal Transcribed



Spacer) l'arbre phylogénétique n'est pas utilisé pour la caractérisation des microbiotes de l'ITS1.

- `Align_seqs.py` utilise par défaut la méthode PyNAST (*Python Nearest Alignment Space Termination*) qui aligne les séquences sur une base de données sans la prise en compte d'éventuels *gaps* (Caporaso, Bittinger, *et al.*, 2010).
- `Filter_alignment.py` filtre l'alignement en retirant les positions qui s'avèrent être des *gaps* dans toutes les séquences, ce qui arrive régulièrement lorsque de petits fragments d'un gène sont comparés à tout un gène tel que le 16S.
- `Make_phylogeny.py` génère l'arbre phylogénétique sur base des séquences alignées et filtrées en utilisant la méthode *FastTree* (Price, Dehal and Arkin, 2009).

#### b. Analyse des données après traitement

Pour les analyses suivantes, les résultats ont été générés pour tous les échantillons dans leur ensemble, tous microbiotes et tous essais *in vivo* confondus. Dans un premier temps, les essais *in vivo* ont été comparés entre eux afin de caractériser les variations entre ces deux derniers. Ensuite, ceux-ci ont été séparés ainsi que leurs microbiotes respectifs afin de caractériser les variations au sein des différents microbiotes. Cela a nécessité de nouvelles tables OTU générées à l'aide du script `filter_samples_from_otu_table.py`.

Par ailleurs, ces résultats ont été générés sur base d'une table OTU raréfiée générée avec le script `alpha_rarefaction.py`. La profondeur de séquençage a été choisie pour chaque type de microbiote sur base de l'échantillon contenant le moins de séquence, données obtenues grâce au script `biom summarize-table`. Cependant, il a été choisi de ne pas sélectionner une profondeur de séquençage inférieure à 1000 séquences sauf si celle-ci éliminait trop d'échantillons. L'évolution de la diversité

#### i. Analyse des taxons observés

Afin d'évaluer la composition des communautés bactériennes selon les paramètres expérimentaux ou le microbiome sondé de la plante, des histogrammes ont été générés avec le script `summarize_taxa_through_plots.py`.

Ensuite, les variations entre les communautés bactériennes ont été évaluées à l'aide de plusieurs scripts.

- `Compute_core_microbiome.py` identifie les OTUs présents dans un pourcentage choisi d'échantillons.
- `Differential_abundance.py` identifie des OTUs qui diffèrent entre deux groupes d'échantillons.
- `Group_significance.py` compare les fréquences des OTUs dans les groupes d'échantillons et détermine s'il y a des différences statistiquement significatives entre les abondances des OTUs dans les différents groupes. Dans ce cas, le test de Kruskal Wallis a été utilisé.

#### ii. Analyse de la diversité $\alpha$

L'alpha diversité a été utilisée pour comparer les éventuelles variations du microbiote au sein des échantillons. Plusieurs indices d'alpha diversité ont été utilisés et permettent d'évaluer la diversité ou la richesse d'un échantillon. Chao1 et le nombre d'OTUs observés sont tous deux des mesures du nombre de taxons présents dans les échantillons et caractérisent ainsi la richesse de ces derniers tandis que l'indice de Shannon et *PD (Phylogenic Diversity) whole tree* permettent d'évaluer la diversité des organismes présents dans les échantillons. Dans le cas de l'ITS1, l'indice *PD whole tree* n'a pas été utilisé car la phylogénie n'est pas toujours recommandée pour cette région. Les données brutes relatives à ces indices ont été générées pour chaque échantillon avec le script `alpha_diversity.py`.

En complément de QIIME, ces données brutes ont ensuite été traitées avec le programme Minitab 18. Des tests d'analyse de la variance à une variable ainsi qu'un test de Fisher ont été effectués afin de mettre en évidence d'éventuelles variations significatives entre les différents types d'eau inoculées ou témoins.

### iii. Analyse de la diversité $\beta$

La beta diversité a été utilisée pour comparer les variations entre les échantillons. Les résultats ont été générés avec le script `beta_diversity_through_plots.py` qui réalise une analyse en coordonnées principales (PCoA) et génère des graphiques en trois dimensions.

Cette analyse se base sur deux mesures de diversité  $\beta$  qui peuvent être réalisées par ce script selon si une phylogénie est utilisée ou non. Unifrac est une mesure utilisant la phylogénie tandis que l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis ne l'est pas, cette dernière a ainsi été utilisée pour les analyses d'échantillons d'ITS1 tandis que Unifrac l'a été pour les échantillons d'ARNr 16S. Une autre distinction doit également être apportée car la mesure de la distance Unifrac peut se faire de manière pondérée (*weighted*) ou non pondérée (*unweighted*) et permet ainsi de prendre ou non compte de l'abondance des différentes OTUs (Lozupone *et al.*, 2007). Dans ce cas, l'analyse pondérée a été préférée car elle tient compte de l'abondance des différents organismes. La mesure de l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis tient également compte de l'abondance des différents OTU (Ricotta and Podani, 2017).

Finalement, les coordonnées des trois axes de variation principaux ont été importées dans le programme Minitab 18 afin de permettre la mise en évidence de groupes d'échantillons présentant peu de variations en termes de diversité  $\beta$ . Cela a été réalisé grâce à une analyse multivariée d'observations en groupe mesurant les distances euclidiennes entre chaque échantillon sur base des coordonnées fournies. Ces groupes peuvent être définis sur base d'un pourcentage de similarité entre échantillons ou d'un nombre de groupe souhaité. Dans la majorité des cas, l'utilisation d'un pourcentage de similarité de 75% a été préféré.

#### 2.1.3. Ajout des séquences rejetées après appariement des *reads forward* et *reverse*

Le plan de travail utilisé pour évaluer l'effet de l'ajout des séquences rejetées du *read forward* après l'appariement des *reads forward* et *reverse* est le même que suivi dans la partie 2.1.2 Analyse des données des essais *in vivo*. La seule différence réside dans la fusion de deux fichiers

générés par le script `multiple_join_paired_ends.py`: celui contenant les *reads forward* non appariés et celui contenant l'appariement des *reads forward* et *reverse*.

## **V. RÉSULTATS**

---

### **1. Evaluation des méthodes d'assignation taxonomique**

L'évaluation de l'efficacité de trois méthodes d'assignation taxonomique, UCLUST, blast et RDP classifier, a été basée sur la comparaison entre la taxonomie qui a été assignée sur QIIME suite à l'application du plan de travail à la vraie répartition taxonomique de la *mock community*.

Le premier résultat est que quelle que soit la méthode d'assignation taxonomique utilisée, il n'y a pas de différence des taxons observés, les trois méthodes attribuent la même taxonomie avec les mêmes abondances relatives. De plus, l'assignation taxonomique est réalisée jusqu'au genre alors que certaines bactéries étaient assignées jusqu'à l'espèce dans la taxonomie attendue.

Ensuite, les abondances relatives observées des OTUs ne sont pas similaires à celles attendues (Figure 7). En effet, la *mock community* est composée de 21 bactéries représentées en proportions équivalentes. Dans la Figure 7, *Streptococcus* et *Staphylococcus* présentent des abondances relatives attendues plus élevées car 3 et 2 espèces de ces genres étaient respectivement présentes dans l'assignation taxonomique attendue de cette *mock community*. Or, les abondances relatives obtenues suite à l'analyse bioinformatique ne sont ni équivalentes entre elles ni équivalentes aux abondances relatives attendues. De plus, un taxon, *Propionibacterium* n'a pas été observé.

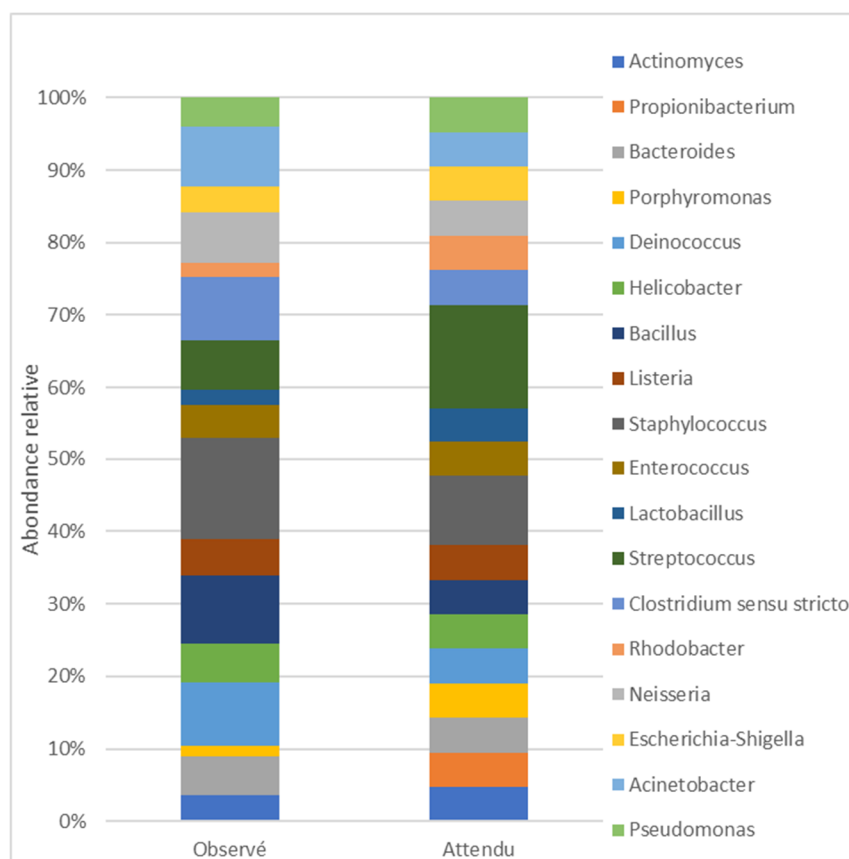


Figure 7 : Représentation de la répartition taxonomique assignée observée suite à l'analyse sur QIIME et de la répartition taxonomique attendue dans la *mock community*

## 2. Ajout du *read forward*

Comme expliqué dans le mode opératoire ci-avant, lors de l'exécution du script `multiple_join_paired_ends.py` les *reads forward* (*read 1* ou *R1*) et les *reads*

*reverse* (ou *read* 2 ou R2) ont été appariés un à un mais à la condition que leurs extrémités se chevauchent. Cependant, lorsque ce n'est pas le cas, les séquences non appariées étaient rejetées pour la suite de l'analyse bioinformatique. L'objectif de cette section est donc d'étudier si l'ajout des *reads* 1 non appariés aux *reads* 1 et 2 appariés influence les résultats de l'analyse bioinformatique.

La première information à la suite de l'analyse bioinformatique est le nombre de séquences qui constituent les échantillons. Le Tableau 1 reprend ainsi les nombres de séquences de l'essai *in vivo* 2 pour ses différents microbiomes.

Tableau 1 : Comparaison du nombre de séquences selon le type de microbiote et l'ajout ou non des reads 1 après l'étape d'appariement des reads 1 et 2. \* : différence significative, \*\* : différence hautement significative, \*\*\* : différence très hautement significative

Région amplifiée	Type d'échantillon	Sans ajout R1 (nombre de séquences)	Avec ajout R1 (nombre de séquences)	Rapport ajout/sans ajout	Test de Fisher
<b>16S</b>	Endosphère	122,0 ± 236,9	2007,2 ± 1665,5	<b>16,5</b>	***
	Rhizoplane	3361,6 ± 2356,2	14502,5 ± 5867,3	<b>4,3</b>	***
	Rhizosphère	2070,8 ± 1772	10726,8 ± 4082,7	<b>5,2</b>	***
	Cultures pures <i>P. chlororaphis</i>	672,3 ± 684,4	9426,3 ± 3408,9	<b>14,0</b>	***
<b>ITS</b>	Endosphère	14280,2 ± 11097,9	15655,0 ± 12073,8	<b>1,1</b>	<b>P-valeur = 0,683</b>
	Rhizoplane	39093,5 ± 28105,1	42659,3 ± 29572,4	<b>1,09</b>	<b>P-valeur = 0,671</b>

Ces données révèlent que, dans le cas des séquences 16S, l'ajout du *read* a permis d'augmenter très hautement significativement le nombre de séquences pour tous les microbiotes et les cultures pures de *P. chlororaphis*. L'ajout du R1 a ainsi permis d'augmenter jusqu'à 16,5 fois en moyenne le nombre de séquences dans les échantillons de l'endosphère qui étaient très basses avant l'ajout du R1 (122,0 ± 236,9). La tendance est également à la hausse du nombre de séquences par échantillon pour la rhizoplane et la rhizosphère même si celle-ci est moindre, respectivement 4,3 et 5,2 fois supérieure.

Cependant, cette même tendance n'est pas constatée pour les échantillons de champignons puisque l'ajout du R1 ne présente pas de différence significative par rapport au cas où il n'est pas ajouté.

Ensuite, la répartition taxonomique de l'ARNr 16S et de l'ITS a été étudié. Afin de simplifier l'analyse de l'ajout du R1, seuls les échantillons de la rhizoplane ont été étudiés. La Figure 1Figure 8 représente ainsi l'abondance relative de l'assignation taxonomique au niveau des phylums pour l'ARNr 16S selon l'ajout ou non du R1 tandis que la Figure 9 correspond à la même comparaison pour l'ITS.

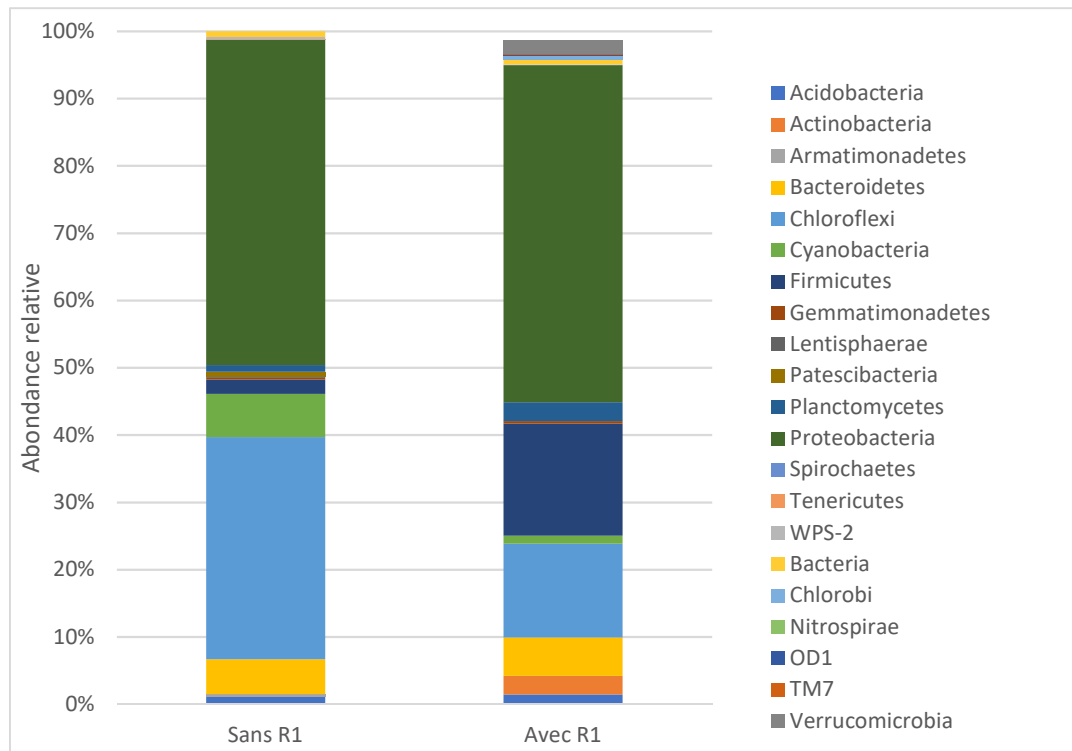


Figure 8 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne des communautés bactériennes dans les échantillons de rhizoplane selon l'ajout du read 1 après l'étape de d'appariement des reads 1 et 2.

L'ajout du R1 pour l'ARNr 16S (Figure 8) montre une nette augmentation du nombre de phylums observés. Effectivement, sans l'ajout du R1, 17 phylums étaient dénombrés tandis que l'ajout du R1 augmente ce nombre à 31, soit une augmentation de 85%. Parmi ces phylums, les *Verrucomicrobes*, *Chlorobi*, *Nitrospirae* sont retrouvés en majorité. Les abondances relatives des phylums déjà détectés en sont également affectées. On remarque une nette diminution des abondances relatives de certains phylums comme les *Chloroflexi* (-19,1%) et les Cyanobactéries (-5,2%) tandis que d'autres phylums comme les Firmicutes (+14,5%) et les Actinobactéries (+2,7%) sont en nettes augmentations. Les autres phylums étant soit en légère diminution ou légère augmentation. Cependant, même si les abondances relatives ne varient pas, le nombre de séquences augmentant significativement, cela signifie que de nouvelles séquences sont aussi intégrées dans ces phylums à abondances constantes.

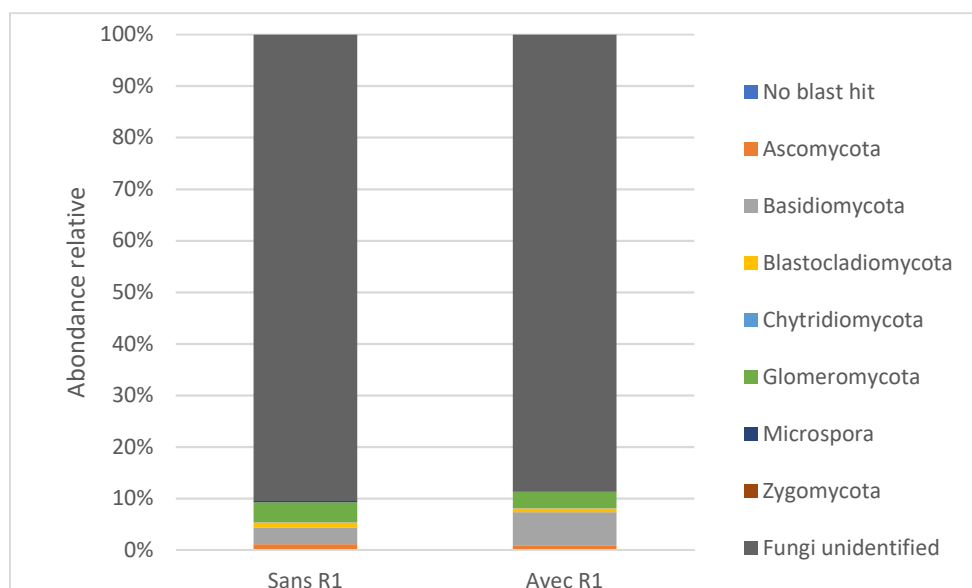


Figure 9 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne des communautés fongiques dans les échantillons de rhizoplane selon l'ajout du read 1 après l'étape d'appariement des reads 1 et 2.

Concernant l'ajout du R1 aux échantillons d'ITS, aucune tendance n'est observée quant à l'observation de nouveaux phylums. En effet, le nombre de ceux-ci n'a pas été affecté (7). Malgré cela, des variations d'abondance relatives sont observées comme pour les Basidiomycètes (3,18% à 6,50%) et les Glomérormycètes (3,86% à 3,07%). Une diminution de séquences de champignons non identifiés est également constatée (90,50% à 88,62%).

L' $\alpha$ -diversité a finalement été évaluée à travers trois indices pour en comparer son évolution suite à l'ajout des reads 1 : Chao 1, les OTUs observés et l'indice de Shannon (Tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison des indices d' $\alpha$ -diversité chao1, OTUs observés et Shannon selon l'ajout du *read* 1 après l'étape de fusion des *reads* 1 et 2. \* : différence significative, \*\* : différence hautement significative, \*\*\* : différence très hautement significative.

	Indice d' $\alpha$ -diversité	Sans ajout R1	Avec R1	Test Fisher
<b>16S rhizoplane</b>	Chao1	196,9 $\pm$ 77,3	634,9 $\pm$ 209,7	***
	OTUs observés	143,8 $\pm$ 58,9	478,5 $\pm$ 169,5	***
	Shannon	3,922 $\pm$ 0,744	5,641 $\pm$ 0,866	***
<b>ITS rhizoplane</b>	Chao1	193,7 $\pm$ 98,1	197,7 $\pm$ 103,7	<b>P-valeur = 0,891</b>
	OTUs observés	155,2 $\pm$ 97,1	144,0 $\pm$ 92,4	<b>P-valeur = 0,685</b>
	Shannon	2,862 $\pm$ 2,030	3,135 $\pm$ 2,035	<b>P-valeur = 0,644</b>

L'analyse de la variance réalisée montre des augmentations très hautement significatives pour les indices d' $\alpha$ -diversité des échantillons d'ARNr 16S après l'ajout du R1 montrant ainsi l'apport en termes de diversité dans les échantillons provoqué par cet ajout. En effet, on observe ainsi jusqu'à 3 fois plus d'OTUs dans la rhizoplane des échantillons d'ARNr 16S.

Cependant, cet ajout ne montre pas de différences significatives d' $\alpha$ -diversité pour les échantillons d'ITS.

### 3. Culture pure de *Pseudomonas chlororaphis*

Trois échantillons de la même culture pure de *P. chlororaphis* ont suivi le même protocole que les trois types de microbiomes échantillonnés dans cette expérience afin de servir de témoin et révéler d'éventuelles contaminations lors des manipulations.

La répartition taxonomique jusqu'à l'espèce des trois cultures pures de *P. chlororaphis* est reprise à la Figure 10. Afin d'en faciliter la lecture, les taxa représentés en moyenne à moins de 0,1% ont volontairement été retirés de cette figure.

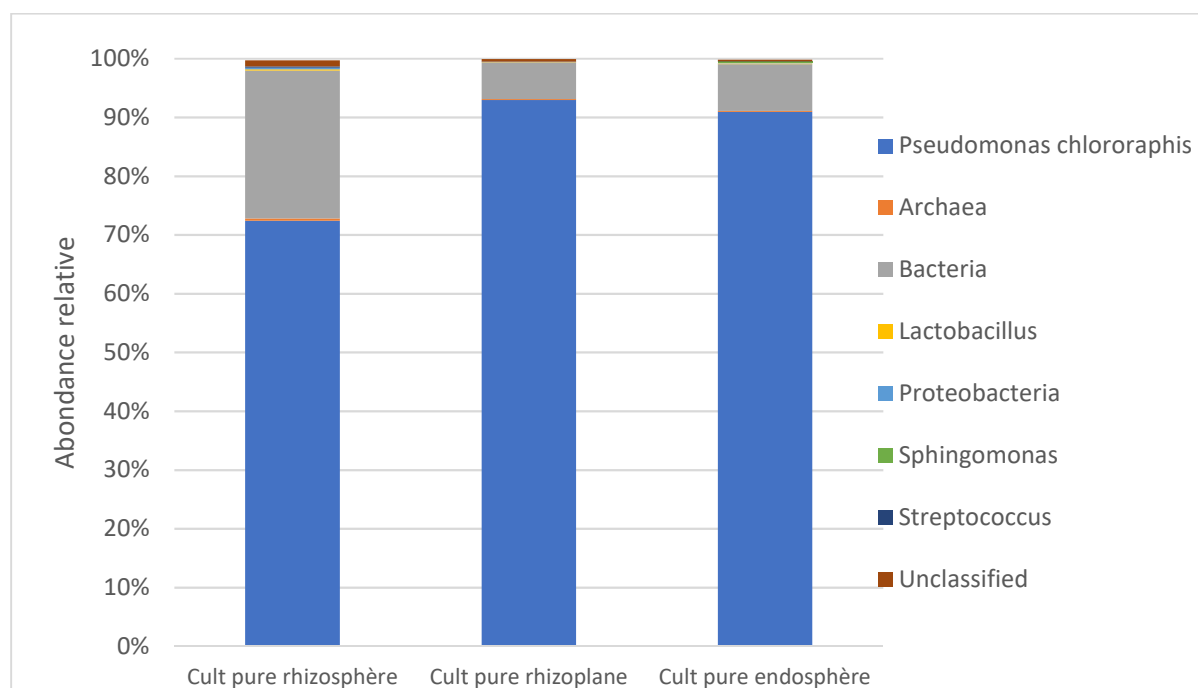


Figure 10 : Représentation de la répartition taxonomique de la population bactérienne des cultures pures de *P. chlororaphis*.

Les abondances relatives des trois cultures pures de *P. chlororaphis* présentent des différences et particulièrement celle extraite en même temps que les échantillons de rhizosphère. En effet, 72,4% des séquences ont été assignées à *P. chlororaphis* tandis que pour les deux autres cultures pures extraites avec la rhizoplane et l'endosphère, 93,0 et 91,0% des séquences y sont respectivement assignées. De plus, la culture pure de rhizosphère présente 25,1% de séquences de bactéries non assignées à un phylum contre 6,3 et 8,0% pour les deux autres cultures pures.

Ces séquences non assignées mais tout de mêmes présentes en proportions non négligeables ont ainsi été soumises à un BLASTn afin d'essayer d'obtenir plus d'informations à propos de ces séquences. En effet, l'utilisation d'un BLASTn sur la plateforme NCBI permet de comparer les séquences à d'autres bases de données que SILVA qui reprend uniquement des séquences d'ARNr 16S.

Parmi ces séquences, les 10 majoritaires ont été blastées et présentaient toutes de très hautes similarités avec le génome de *P. chlororaphis* mais ces dernières n'appartenaient pas à l'ARNr 16S. Il s'agit ainsi probablement d'une amplification non spécifique de ces séquences, cela a donc été vérifié par l'analyse de la fixation des amorces utilisées sur ces parties du génome de



*P. chlororaphis*. Sur ces 10 séquences, entre 9 et 10 bases de l'extrémité 3' des amorces *forward* et *reverse* pouvaient ainsi s'apparier avec le génome de *P. chlororaphis* avec jusqu'à un mismatch pour certaines séquences.

La nouvelle répartition taxonomique en considérant ces résultats est reprise à la Figure 11. Afin d'en faciliter la lecture, les taxa représentés en moyenne à moins de 0,1% ont volontairement été retirés de cette figure.

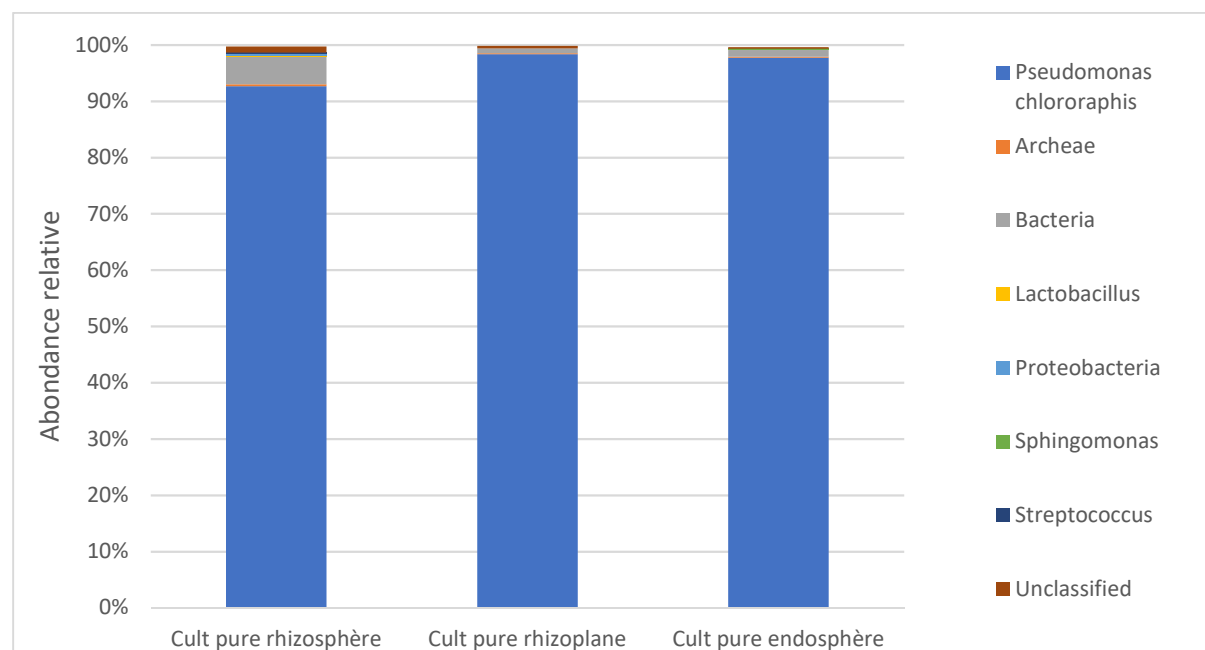


Figure 11 : Représentation de la répartition taxonomique de la population bactérienne des cultures pures de *P. chlororaphis* après blast des 10 séquences majoritaires non assignées lors de l'analyse bioinformatique sur QIIME.

Ce complément d'assignation taxonomique grâce à l'outil BLAST a ainsi permis de réduire les proportions de bactéries non assignées et d'augmenter les proportions de *P. chlororaphis* dans les trois cultures pures. Ainsi, des augmentations de 20,2 ; 5,4 et 6,8% d'abondance de *P. chlororaphis* sont constatées. De plus, toutes les séquences non assignées n'ont pas été blastées, il reste dès lors 4,9 ; 0,85 et 1,2% de séquences non assignées pour respectivement la rhizosphère, la rhizoplane et l'endosphère.

Cependant, contrairement à ce qui pourrait être attendu dans une culture pure contenant en théorie un seul organisme, les échantillons contiennent d'autres taxons. En effet, entre 1,4 et 7% des séquences ne sont pas assignées à *P. chlororaphis* dont entre 0,6 et 2,1% de séquences assignées à des Archées ou à des genres bactériens. De ce fait, plusieurs genres bactériens comme *Lactobacillus*, *Sphingomonas* et *Streptococcus* sont ainsi retrouvés à des abondances relatives comprises entre 0,22 et 0,25% mais ne sont cependant pas systématiquement présents dans les échantillons de culture pure.

#### 4. Evaluation des différences entre les deux expérimentations *in vivo*

Cette partie vise à identifier si l'analyse conjointe des données liées aux deux expériences *in vivo* est possible car bien qu'ayant des conditions expérimentales identiques, ces expériences présentent quelques différences. En effet, en plus d'avoir été réalisées à des moments différents,

les eaux utilisées peuvent varier légèrement et particulièrement les eaux aquaponiques (AP) et aquaponiques complémentées (AP+). Effectivement, l'eau AP provient de la PAFF Box (Plant And Fish Farming Box) de l'unité de Phytopathologie et d'Agriculture Urbaine de Gembloux Agro Bio-Tech et il s'agit d'un système dynamique dont le microbiote y étant présent a pu varier selon le moment de prélèvement. Ces différences pourraient ajouter un biais supplémentaire non souhaité aux conditions expérimentales, il est ainsi important de les caractériser.

Cette analyse a été réalisée à travers l'étude séparée des trois microbiotes (rhizoplane, rhizosphère et endosphère) car l'hypothèse qu'ils présentent une diversité d'organismes différente a été posée. De plus, l'analyse de la diversité beta pour marquer les différences entre les échantillons et pouvoir mettre en évidence des groupes d'échantillons a principalement été utilisée pour répondre à la problématique. Afin de faciliter cette analyse, seuls les échantillons d'ARNr 16S ont été utilisés dans cette partie.

#### 4.1. Rhizoplane

L'étude de la diversité beta a été réalisée grâce à une analyse en coordonnées principales (PcoA) à partir des distances UniFrac et pondérées (*weighted*) (Figure 12).

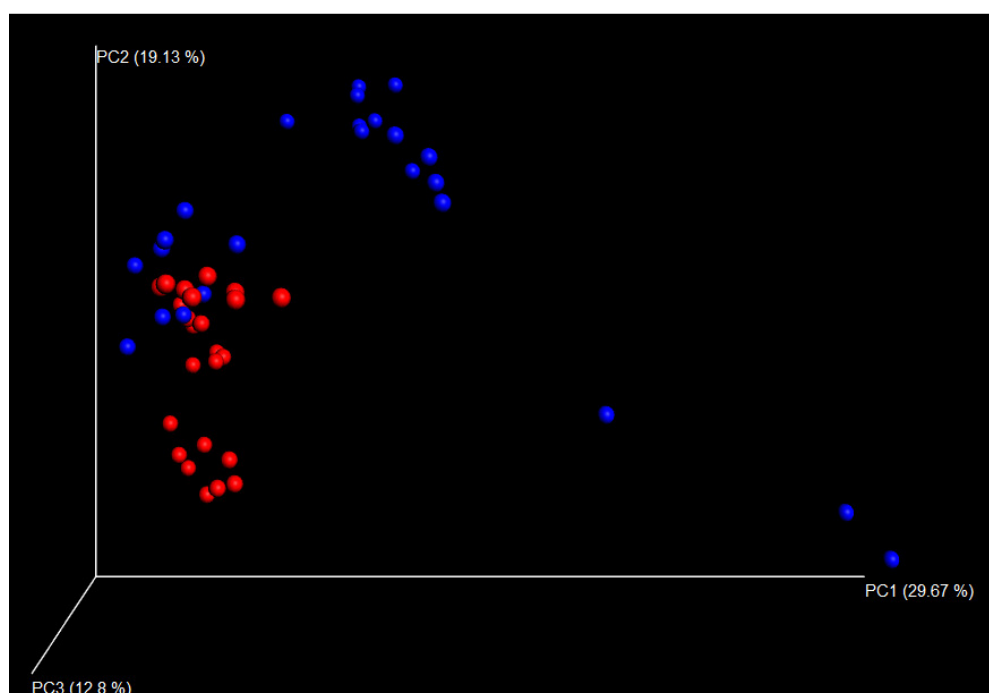


Figure 12 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de la rhizoplane. Rouge : Essai *in vivo* 1 ; Bleu : Essai *in vivo* 2

Cette analyse en coordonnées principales permet de visualiser que les essais 1 et 2 tendent à se dissocier même si une partie des échantillons de l'essai *in vivo* 2 tendent à se mélanger à ceux de l'essai *in vivo* 1.

Une analyse multivariée d'observation en groupes a ensuite été réalisée sur base des distances entre chacun des échantillons repris dans la Figure 12 afin de mettre en évidence les groupes

partageant des caractéristiques. Ainsi, un dendrogramme est généré reprenant les groupes d'échantillons présentant au minimum 75% de similarités (Figure 13).

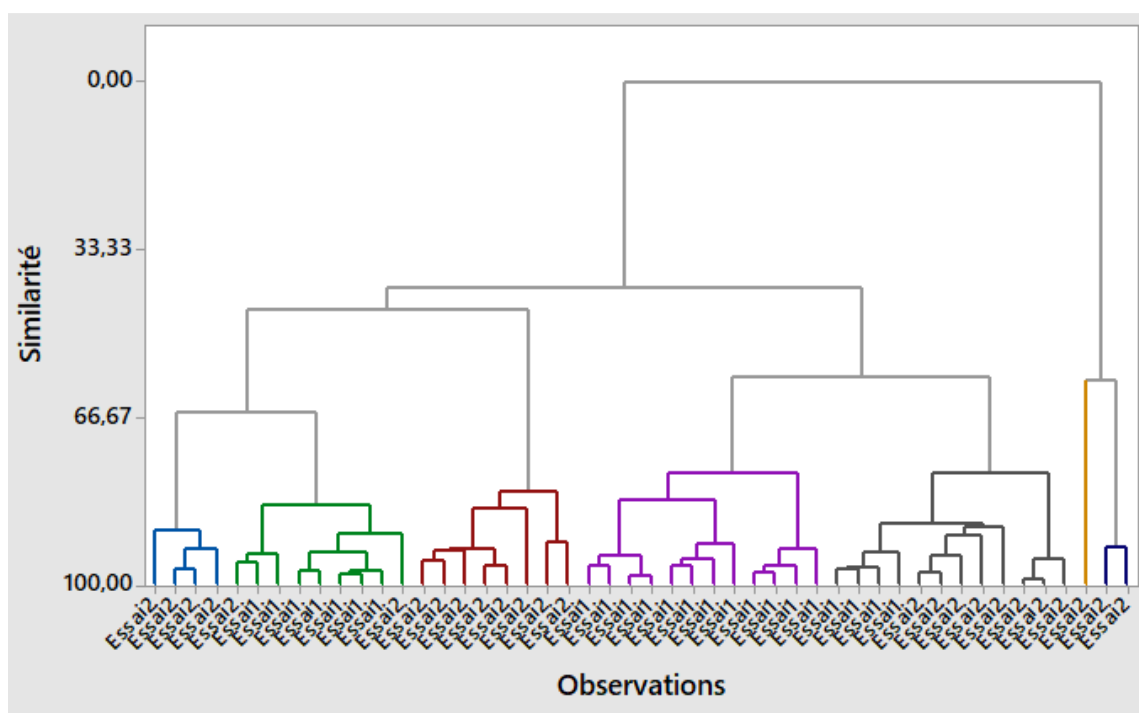


Figure 13 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de la rhizoplane des essais *in vivo* 1 et 2.

Ce dendrogramme met ainsi en évidence que deux clusters pour chaque essai *in vivo* ne se forment pas aisément. Cependant, les groupes formés sont généralement constitués d'échantillons appartenant au même essai *in vivo* montrant ainsi une certaine différenciation entre ces essais.

De plus, une analyse plus poussée des résultats permet de déterminer que les échantillons de l'essai 2 semblant se mélanger aux échantillons de l'essai 1 sont ceux d'eau hydroponique (HP), d'eau hydroponique inoculée avec *P. aphanidermatum* (HPPA) et d'eau aquaponique inoculée avec *P. aphanidermatum* (APPA).

Finalement, un test Adonis a été réalisé sur base de la matrice de distance de l'analyse PcoA et a fait ressortir une différence très hautement significative entre les deux essais *in vivo*.

## 4.2. Endosphère

L'étude de la diversité beta à travers une PcoA et l'analyse multivariée d'observation en groupe selon la similarité des échantillons sont repris dans les Figure 14 et Figure 15.

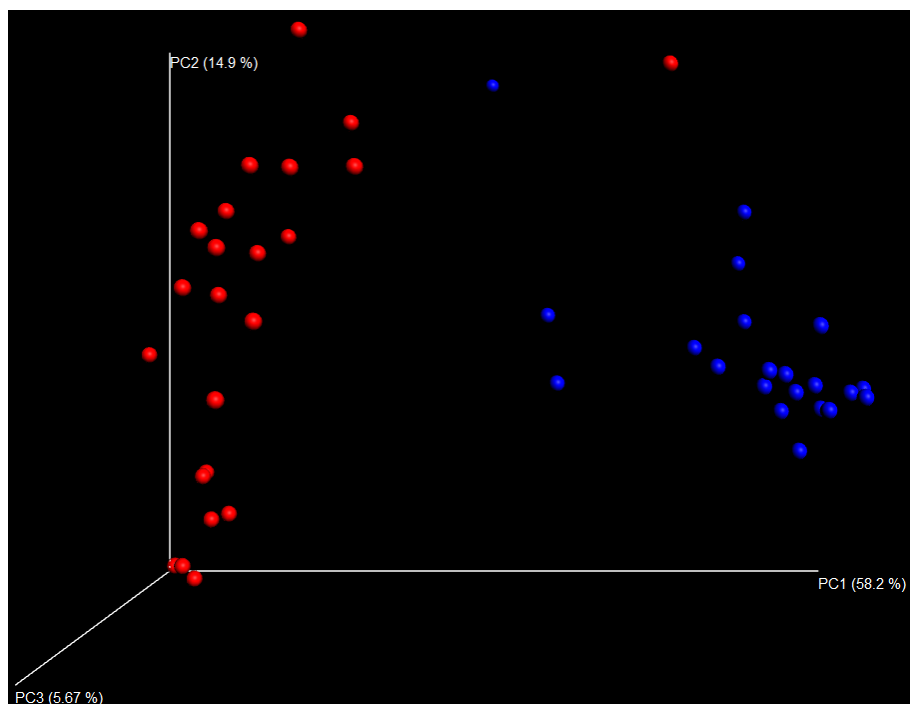


Figure 14 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communauté bactériennes d'endosphère. Rouge : Essai *in vivo* 1 ; Bleu : Essai *in vivo* 2

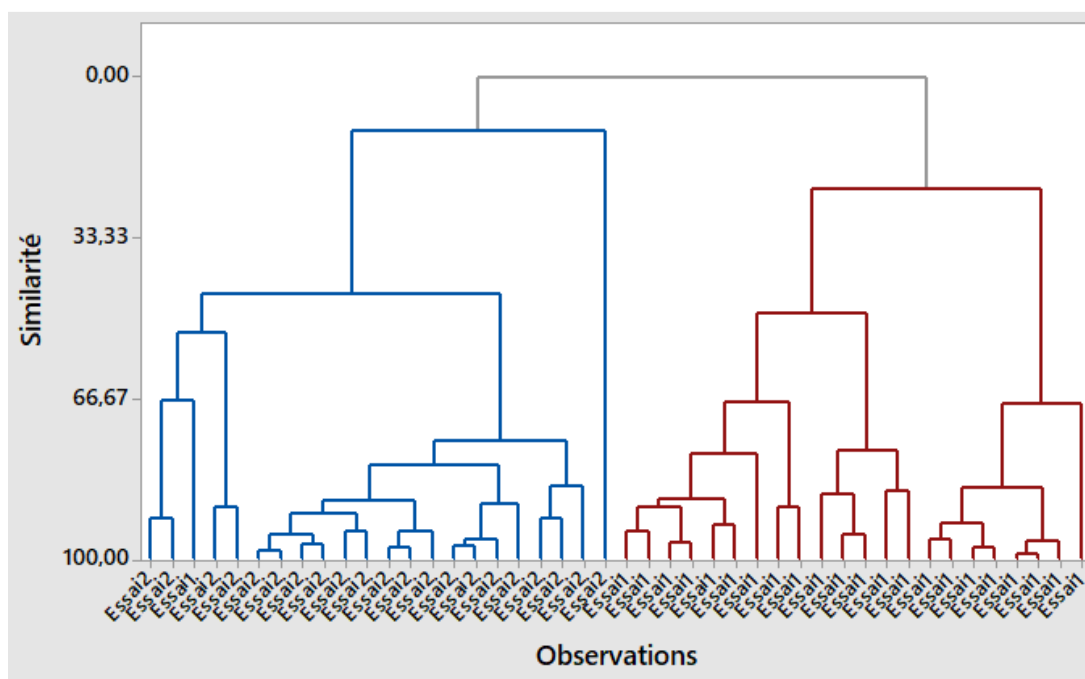


Figure 15 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes d'endosphère des essais *in vivo* 1 et 2.

Ces analyses montrent une forte différenciation entre ces deux essais. En effet, les échantillons sont spatialement séparés dans la PCoA et l'analyse statistique permet de confirmer cette observation étant donné que seul un échantillon de l'essai 1 est clusterisé avec ceux de l'essai 2. Tout comme pour la rhizoplane, un test statistique Adonis mis en évidence une différence très hautement significative entre les deux essais *in vivo*.

### 4.3. Rhizosphère

De même que pour la rhizoplane et l'endosphère, l'étude de la diversité beta à travers une PCoA et l'analyse multivariée d'observation en groupe selon la similarité des échantillons sont repris dans les Figure 16 et Figure 17.

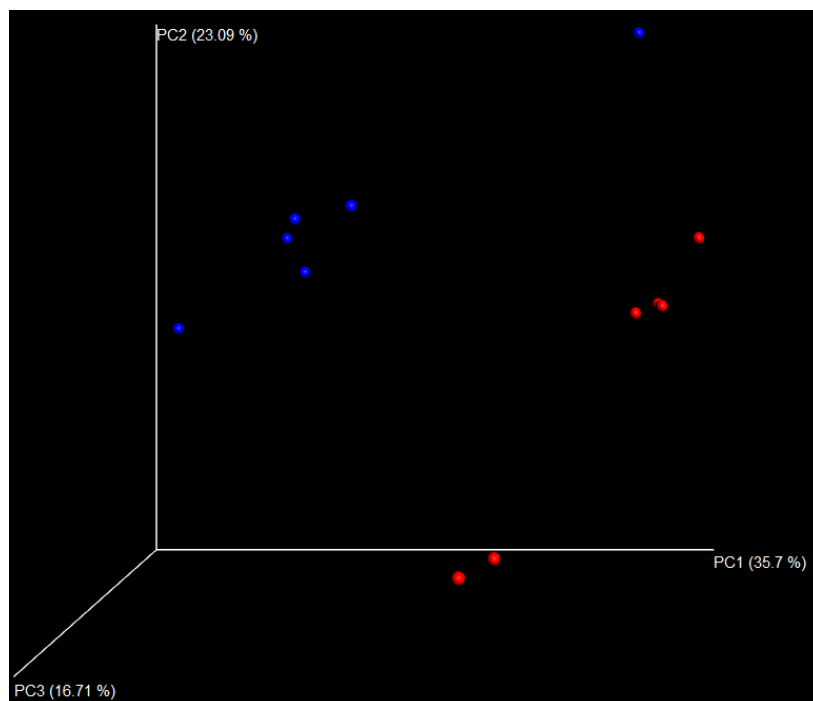


Figure 16 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de rhizosphère. Rouge : Essai *in vivo* 1 ; Bleu : Essai *in vivo* 2

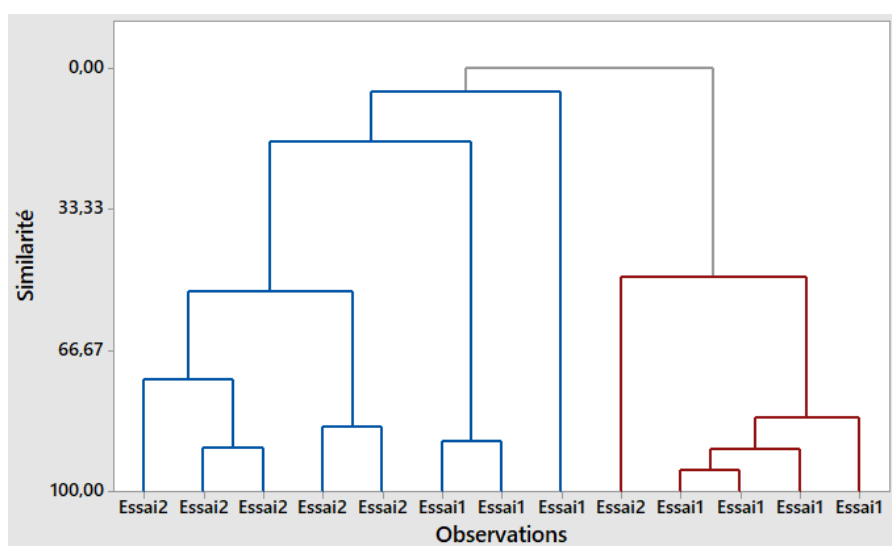


Figure 17 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de rhizosphère des essais *in vivo* 1 et 2.

Ici, bien que d'un point de vue spatial les deux essais semblent relativement bien différenciés dans la PCoA, au niveau du dendrogramme deux échantillons de l'essai 1 sont repris dans le groupe de l'essai 2 et un échantillon de l'essai 2 est repris dans le groupe de l'essai 1. En

complément, un test statistique Adonis fait ressortir une différence hautement significative entre ces deux essais *in vivo*.

## 5. Etude de l'essai *in vivo* 1

La variation au sein de de l'essai *in vivo* 1 est étudiée afin d'essayer de mettre en évidence des organismes qui pourraient avoir un effet antagoniste contre les agents pathogènes présents en aquaponie. En effet, un effet suppressif a été observé en eau aquaponique après l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum* mais pas dans les eaux hydroponique et aquaponique complémentée. Dès lors, les différences entre ces eaux et leur influence sur les différents microbiotes (rhizosphère, rhizoplane et endosphère) vont être évaluées à travers l'analyse des diversités  $\alpha$  et  $\beta$ , de la répartition taxonomique et des différences significatives de taxons entre les différents types d'eaux présentes dans les bacs de culture.

### 5.1. Rhizoplane

#### 5.1.1. Communautés bactériennes

Tout d'abord, la répartition taxonomique moyenne des différentes conditions expérimentales (Figure 18) met en évidence des différences au niveau des microbiotes.

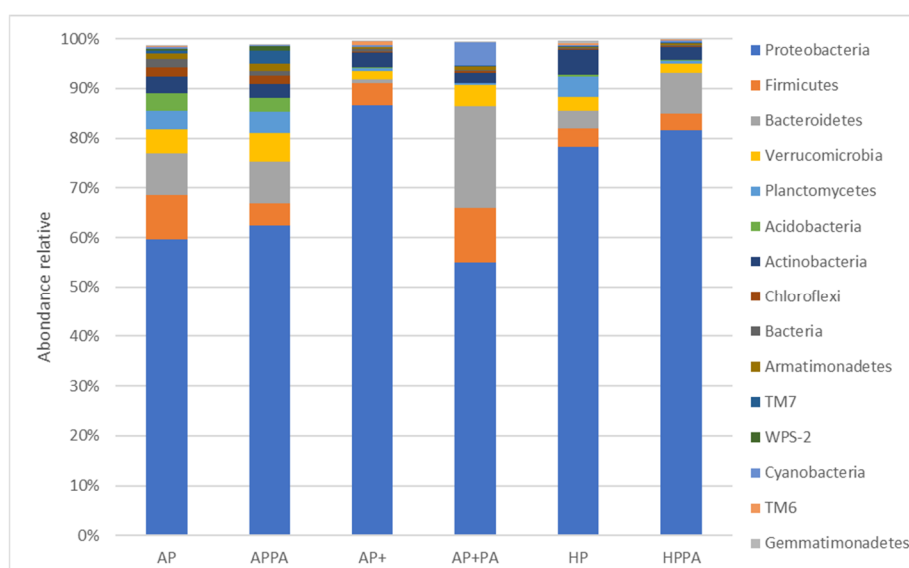


Figure 18 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population microbienne de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*. Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique.

En effet, au niveau des phylums, des différences d'abondances relatives sont principalement observées au niveau des Protéobactéries qui sont présentes en abondances plus élevées en AP+ (86,6%) et HP (78,2%) qu'en AP (59,5%). De même, AP présente une plus grande diversité de phylums (31) que AP+ (23) et HP (21). Globalement, on observe ainsi une tendance à la différenciation entre les différents types d'eaux.

Ensuite, la diversité  $\beta$  a été analysée à travers une PCoA (Figure 19) et une analyse multivariée en observation en groupe (Figure 20).

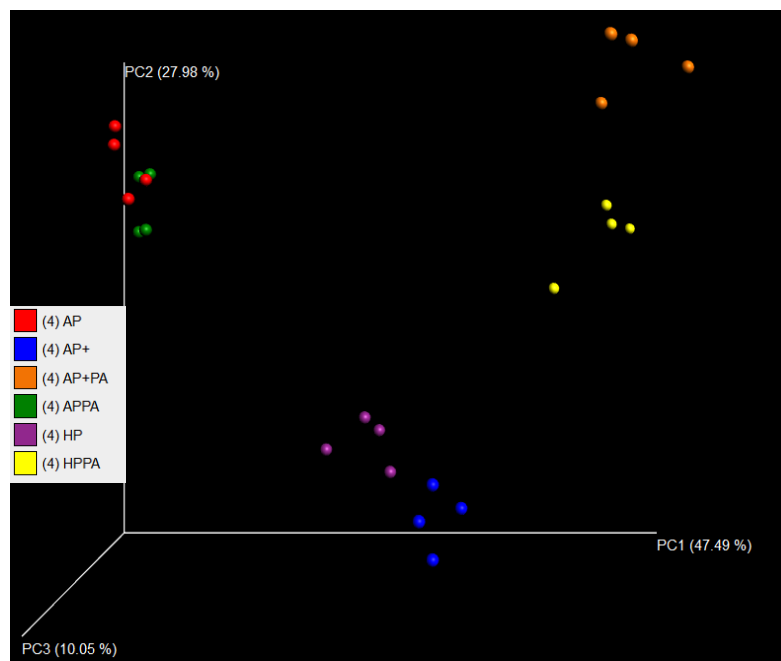


Figure 19 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.

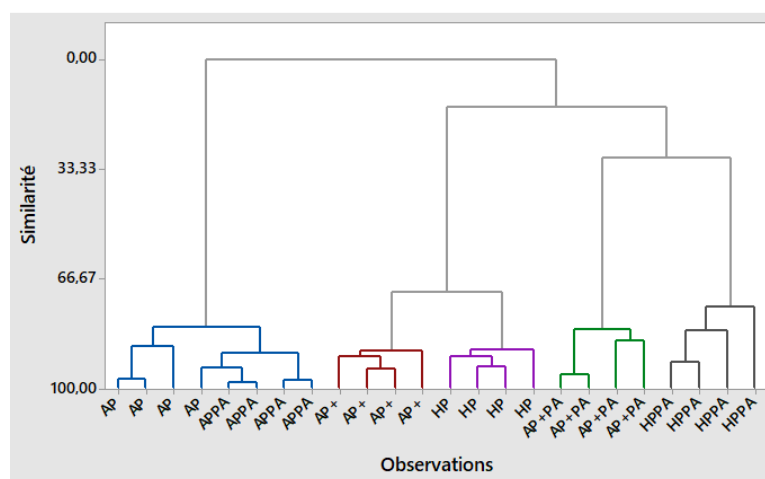


Figure 20 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum*.

Sur base de ces analyses, il est observé une très bonne clusterisation des différents paramètres expérimentaux. En effet, AP+, HP, AP+PA et HPPA forment tous des clusters différents présentant plus de 75% de similarité. De plus, l'inoculation de *P. aphanidermatum* en AP+ et HP semble avoir influencé ces microbiotes de manière relativement similaire puisque ces eaux restent proches dans l'analyse PCoA. Cependant, cela n'est pas observé dans le cas d'AP et APPA où l'inoculation n'a pas entraîné de différences en termes de diversité  $\beta$ .

La diversité  $\alpha$  est également étudiée à travers 4 indices, Chao 1, le nombre d'OTUs observés, l'indice de Shannon et PD whole tree (Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau des indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon et PD whole tree) des échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphani dermatum*.

Eau	Chao1				OTUs observés				Shannon				PD whole tree			
	N	Moyenne	EcTyp	Groupe ment	N	Moyenne	EcTyp	Groupe ment	N	Moyenne	EcTyp	Groupe ment	N	Moyenne	EcTyp	Groupe ment
APPA	4	928,2	78,4	A	4	671	60,6	A	4	6,839	0,221	A	4	48,6	2,78	A
AP	4	789	29,8	B	4	601	19,3	A	4	6,5677	0,0911	A	4	45,178	1,096	B
HP	4	608,6	25	C	4	434,75	16,58	B	4	5,217	0,215	B	4	28,698	0,411	C
AP+PA	4	599,2	66	C D	4	391	52	B	4	5,32	0,226	B	4	27,79	2,41	C
AP+	4	630,34	16,57	C	4	428	20,8	D	4	3,531	0,433	D	4	29,085	1,239	C
HPPA	4	523,1	60,9	D	4	341	31,4	C	4	4,4009	0,1374	C	4	22,897	1,541	D

Ces indices permettent de mettre en évidence que AP et APPA présentent toujours une diversité et une richesse spécifique significativement plus élevée que HP, AP+, HPPA et AP+PA. Pour 2 des 4 indices, des différences significatives sont toutefois observées entre AP et APPA, AP qui tendrait à être légèrement moins diversifié et moins riche que APPA.

Finalement, les différences significatives au niveau des abondances de taxons dans les différentes eaux ont été investiguées. Pour faciliter la comparaison et inclure le moins de variations possible, les groupes d'échantillons ont tout d'abord été comparés par paires.

Dans un premier temps, les *shifts* dans les microbiotes ont été évalués entre AP et HP et entre AP et AP+. De plus, compte tenu de l'objectif qui est l'identification d'organismes antagonistes et du fait que l'effet suppressif n'a été observé qu'en AP, seuls les organismes présents en quantités significativement plus importantes en AP semblent intéressants. Dès lors, la comparaison entre AP et AP+ a permis de mettre en évidence que 46 OTUs présentaient des abondances relatives significativement plus élevées en AP tandis que 93 OTUs présentaient cette même caractéristique lors de la comparaison AP et HP dont 43 étaient communs aux deux comparaisons.

Ce raisonnement a également été appliqué aux comparaisons entre APPA et HPPA et entre APPA et AP+PA. Dans ce cas, 102 OTUs présentaient des abondances relatives significativement plus élevées en APPA qu'en AP+PA, 111 présentaient les mêmes caractéristiques entre APPA et HPPA et 98 OTUs étaient communs aux deux comparaisons.

Le Tableau 4 reprend ainsi les différents organismes mis en évidence si ces derniers étaient au moins identifiés jusqu'au rang taxonomique de la famille. De plus, les OTUs ayant la même assignation taxonomique n'ont été retranscrits qu'une seule fois.

Tableau 4 : Liste des taxons de bactéries identifiés comme présentant des abondances relatives significativement plus élevées en AP qu'en AP+ et HP ou en APPA qu'en AP+PA et HPPA.

Taxon identifié		Baisse significative de AP vers AP+ et HP	Baisse significative de APPA vers AP+PA et HPPA
Famille	Genre espèce		
<i>Caldilineaceae</i>		Oui	Non
<i>Pirellulaceae</i>		Oui	Non
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Leptothrix</i>	Oui	Oui



<i>Comamonadaceae</i>	<i>Methylibium</i>	Oui	Oui
<i>Cytophagaceae</i>		Oui	Oui
<i>Gemmataceae</i>		Oui	Oui
<i>Hyphomonadaceae</i>		Oui	Oui
<i>Opitutaceae</i>	<i>Opitutus</i>	Oui	Oui
<i>Piscirickettsiaceae</i>		Oui	Oui
<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Planctomyces</i>	Oui	Oui
<i>Saprospiraceae</i>		Oui	Oui
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingobium</i>	Oui	Oui
<i>Syntrophobacteraceae</i>		Oui	Oui
<i>Xanthomonadaceae</i>		Oui	Oui
<i>Acetobacteraceae</i>		Non	Oui
<i>Armatimonadaceae</i>		Non	Oui
<i>Bdellovibrionaceae</i>	<i>Bdellovibrillo</i>	Non	Oui
<i>Bryobacteraceae</i>		Non	Oui
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	Non	Oui
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i>	Non	Oui
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Ramlibacter</i>	Non	Oui
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i>	Non	Oui
<i>Fimbriimonadaceae</i>	<i>Fimbriimonas</i>	Non	Oui
<i>Haliangiaceae</i>		Non	Oui
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium zavarzanii</i>	Non	Oui
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Rhodoplanes</i>	Non	Oui
<i>Methylophilaceae</i>	<i>Methylothera</i>	Non	Oui
<i>Microbacteriaceae</i>		Non	Oui
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	Non	Oui
<i>Neisseriaceae</i>	<i>Vogesella</i>	Non	Oui
<i>Pirellulaceae</i>	<i>Pirellula</i>	Non	Oui
<i>Polyangiaceae</i>		Non	Oui
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>	Non	Oui
<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Azospirillum</i>	Non	Oui
<i>Sinobacteraceae</i>		Non	Oui
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Luteimonas</i>	Non	Oui

Ainsi, le croisement de ces comparaisons permet de faire ressortir 36 taxons, dont 10 sont communs entre les deux comparaisons.

#### 5.1.2. Communautés fongiques

Dans un premier temps, la répartition taxonomique moyennes des différentes conditions expérimentales (Figure 21) permet d'aborder les premières différences entre celles-ci.

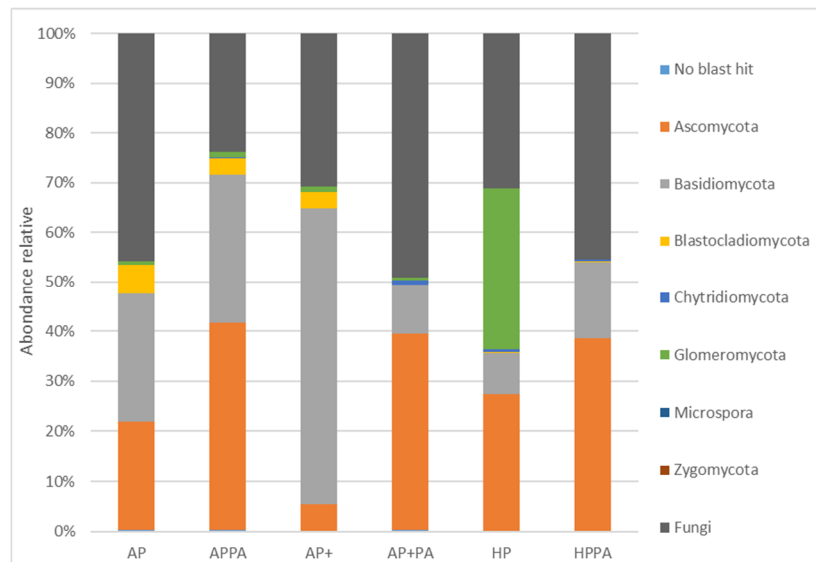


Figure 21 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population fongique de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum*.

En effet, l'assignation taxonomique reprise uniquement jusqu'au niveau des phylums permet déjà de pointer des variations importantes. Des différenciations se marquent ainsi entre tous les paramètres expérimentaux. Seuls AP+PA et HPPA semblent présenter des abondances relatives similaires. De plus, de fortes proportions de séquences uniquement assignées comme étant des champignons sont présentes.

Ensuite, la diversité  $\beta$  a été analysée à travers une PCoA (Figure 22) et une analyse multivariée en observation en groupe (Figure 23Figure 20).

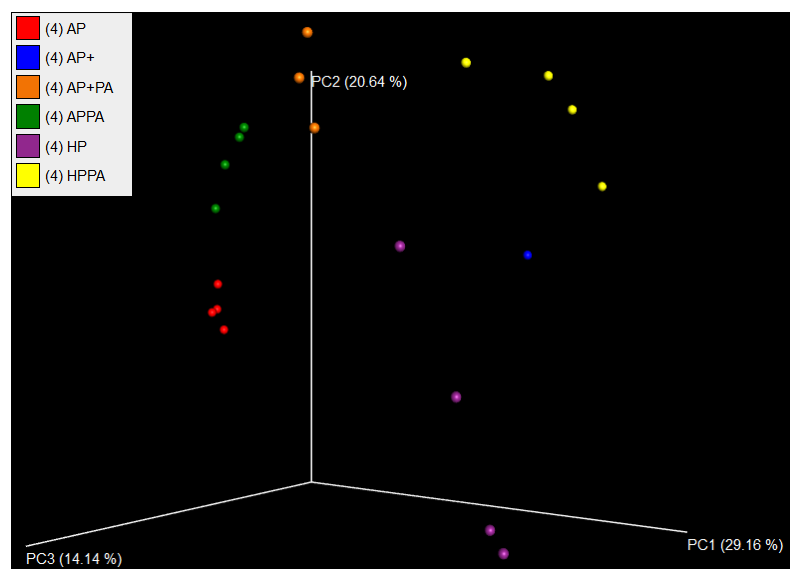


Figure 22 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de rhizoplane. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.

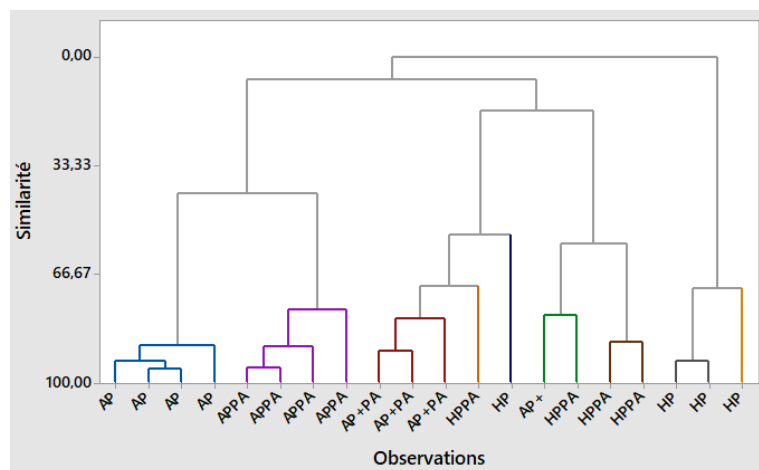


Figure 23 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés fongiques de rhizoplane selon le type d'eau du bac de culture et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*.

Ces analyses permettent de mettre en évidence la clusterisation de différents groupes d'échantillons. En effet, tout comme pour les communautés bactériennes de la rhizoplane, AP et APPA forment des groupes distincts. Cependant, les autres combinaisons de paramètres expérimentaux présentent plus de variabilité et ne forment pas tous des groupes distincts. Malgré cela, les 3 échantillons d'AP+PA sont observés en groupe ainsi que 3 des 4 échantillons d'HP.

Tableau 5 : Tableau des indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon) des échantillons de communautés bactériennes de rhizoplane selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*.

Eau	Chao1				Observed OTU				Shannon			
	N	Moyenne	EcTyp	Groupe	N	Moyenne	EcTyp	Groupe	N	Moyenne	EcTyp	Groupe
AP	4	207,3	56,4	A	4	176,5	37,9	A	4	5,069	0,236	A
AP+PA	3	184,91	6,43	A B	3	152	4,58	A B	3	4,121	0,485	B
APPA	4	212,39	15,35	A	4	155	8,16	A B	4	3,677	0,458	A B
HP	4	184	28,8	B	4	155	23,3	A B	4	4,245	0,921	A B
HPPA	4	158,45	7,99	B	4	132	6,98	B	4	4,399	1,163	A B
AP+	1	178	/	/	1	147	/	/	1	4,7	/	/

L'étude de la diversité  $\alpha$  rejoint partiellement les observations réalisées lors de l'étude de la diversité  $\beta$ . En effet, une variabilité au sein des échantillons empêchait parfois de ne pas observer des groupes distincts, cela est également le cas pour la diversité  $\alpha$  puisque l'étude d'aucun de ces trois indices ne permet de mettre en évidence une hiérarchie à plus de deux niveaux. Cependant, cela met tout de même en évidence que AP et APPA ne présentent pas de différences significatives en termes de diversité et de richesse spécifique.

Ensuite, les différences significatives au niveau des taxons sont également prises en compte. Les déplacements de microbiotes ont été évalués entre AP et HP et entre AP et AP+. Ainsi, la comparaison entre AP et HP a permis de mettre en évidence 25 OTUs présentant des abondances relatives significativement plus élevées en AP qu'en HP. Cependant, pour la comparaison entre AP et AP+ il n'est pas possible de réaliser de test statistique car à la suite de problèmes d'amplification par PCR un seul des 4 échantillons d'AP+ a pu être séquencé.

Compte tenu du fait que seuls les taxons étant présents en plus hautes proportions en AP qu'en AP+ et HP sont intéressants dans la comparaison réalisée, il a été recherché de savoir si les OTUs mis en évidence lors de cette première comparaison semblaient également montrer des différences d'abondances relatives entre AP et AP+. À la suite de cette comparaison, au moins 18 OTUs semblaient montrer des abondances relatives plus élevées en AP qu'en AP+. Parmi les organismes mis en évidence lors de ces comparaisons, une très grande majorité des séquences correspondaient en réalité à des champignons non assignés. Par conséquent, seuls trois taxons ont pu être mis en évidence comme étant plus présents en AP qu'en AP+ et HP.

Les comparaisons entre APPA et AP+PA et entre APPA et HPPA ont respectivement permis de mettre en évidence 21 et 12 taxons présentant des abondances significativement plus élevées en AP. De nouveau, la majorité des OTUs ne sont pas assignés taxonomiquement et seuls trois taxons sont plus présents en AP qu'en AP+ et HP.

Ensuite, l'analyse conjointe de ces comparaisons permet de faire ressortir que les trois taxons mis en évidence par ces deux sont identiques et identifiés jusqu'au genre ou l'espèce :

- *Catenaria*
- *Pseudozyma prolifica*
- *Hysterium pulicare*

## 5.2. Endosphère

### 5.2.1. Communautés bactériennes

L'analyse de la répartition taxonomique moyenne selon le type d'eau utilisée ainsi que l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum* est reprise à la Figure 24.

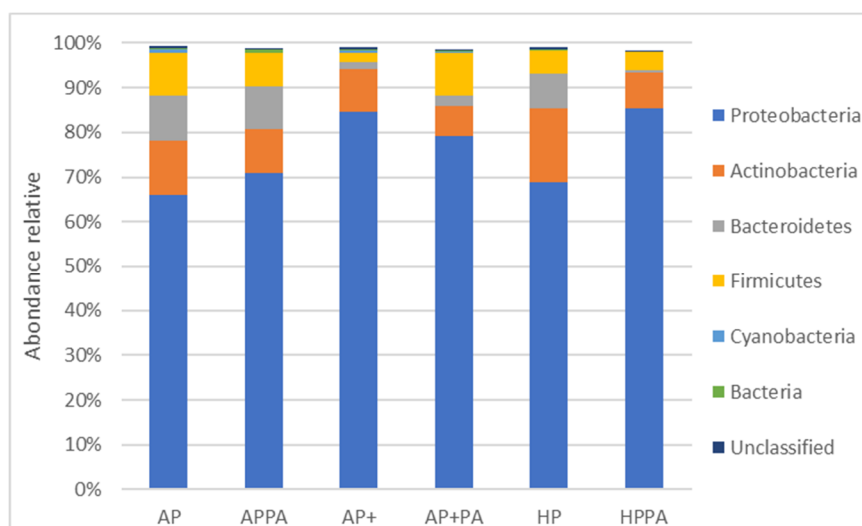


Figure 24 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population bactérienne de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum*. Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique.

Peu de différences sont observées au niveau des phylums. En effet, AP, APPA et HP présentent relativement les mêmes abondances relatives. La variation majeure réside dans les abondances de Proteobactéries qui varient entre 66% (AP) et 85% (HPPA).

De plus, l'analyse conjointe de la diversité  $\beta$  à travers une PCoA (Figure 25) et de l'analyse multivariée d'observation en groupes (Figure 26) met en évidence qu'il y a peu de clusterisation des échantillons selon les paramètres expérimentaux. En effet, seulement les échantillons d'AP+PA et de HPPA sont observés dans le même ensemble.

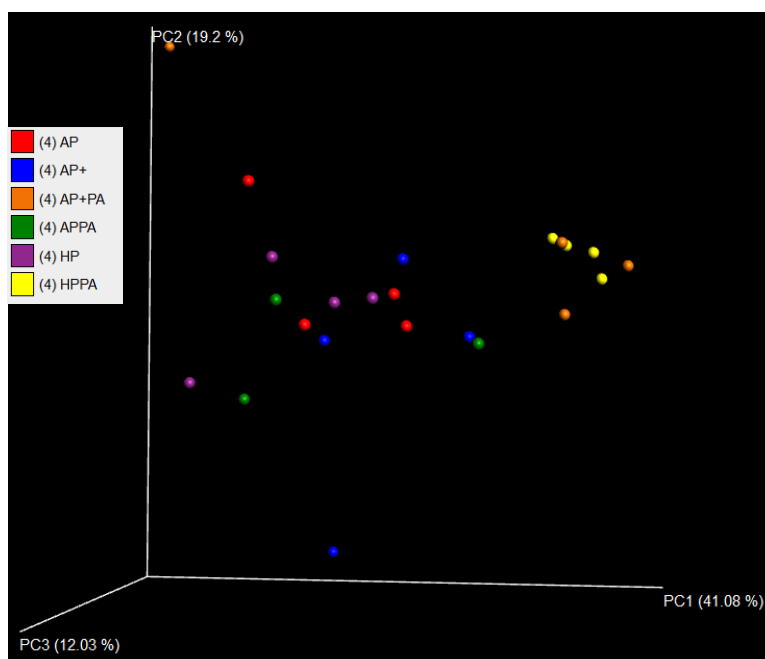


Figure 25 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés bactériennes de l'endosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.

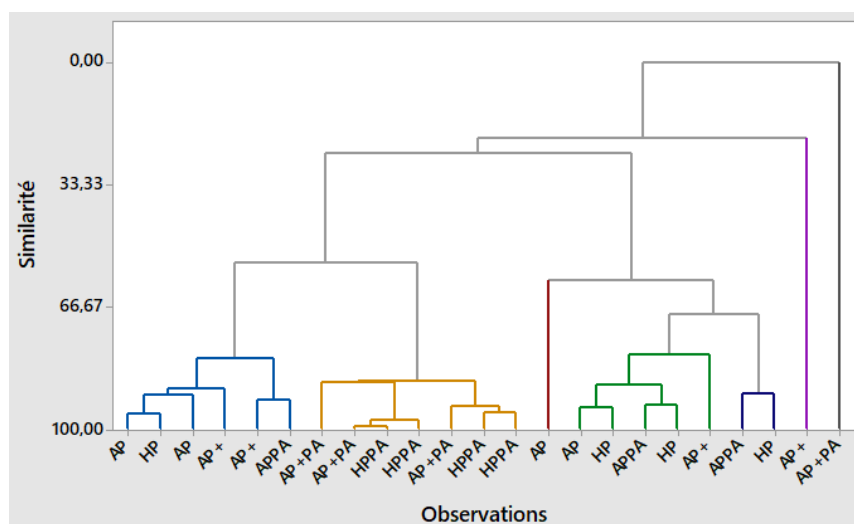


Figure 26 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés bactériennes de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*.

Quatre indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon et PD Whole tree) ont été utilisés afin de caractériser si les paramètres expérimentaux ont une influence sur la diversité au sein des échantillons (Tableau 6).

Tableau 6 : Tableau des indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon, PD Whole tree) des échantillons de communautés bactériennes de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*.

Eau	Chao1				OTUs observés				Shannon				PD Whole tree			
	N	Moyenne	EcTyp	Groupe	N	Moyenne	EcTyp	Groupe	N	Moyenne	EcTyp	Groupe	N	Moyenne	EcTyp	Groupe
HP	4	88,5	26,3	A	4	70,25	16,3	A	4	4,469	0,349	A	4	6,51	2,29	A
AP+	4	80,56	15,83	A	4	65,25	11,79	A	4	4,138	0,595	A B	4	6,015	1	A
AP	4	112,6	22,8	A	4	61,25	7,5	A	4	4,069	0,407	A B	4	6,538	0,467	A
APPA	3	104,6	19,8	A	3	69	12,77	A	3	4,326	0,691	A B	3	6,756	1,68	A
AP+PA	4	94,2	29,1	A	4	60	22,2	A	4	3,373	1,113	B C	4	6,497	1,659	A
HPPA	4	87,2	34,4	A	4	50,75	8,69	A	4	2,702	0,26	C	4	5,941	0,681	A

L'étude de ces indices met en évidence que pour chacun d'entre eux sauf l'indice de Shannon, aucune différence de diversité n'est observée entre tous les échantillons. Cependant, l'indice de Shannon souligne notamment une différence significative de diversité entre HP et HPPA.

L'étude des taxons ne met en évidence aucun OTU présentant des différences significatives d'abondances relatives dans les comparaisons suivantes : AP et HP, AP et AP+, APPA et HPPA, APPA et AP+PA.

### 5.2.2. Communautés fongiques

Pour les communautés fongiques de l'endosphère, la tendance à une différenciation non marquée des microbiotes semble être la même que dans le cas des communautés bactériennes. En effet, l'analyse de la répartition taxonomique au niveau des phylums (Figure 27) est relativement uniforme quels que soient les conditions expérimentales, seules de faibles variations sont observées au niveau des séquences non assignées, des Basidiomycètes et des Ascomycètes.

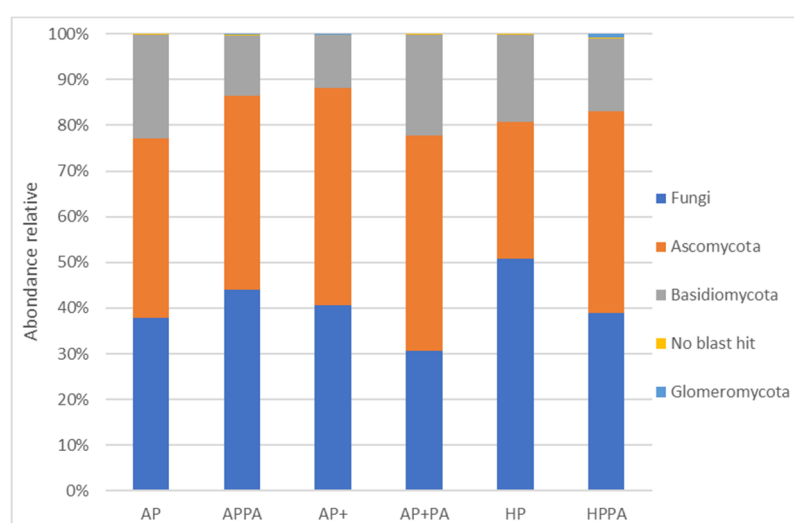


Figure 27 : Représentation de la répartition taxonomique moyenne de la population fongique de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*. Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique.

Dans la continuité, l'analyse de la diversité  $\beta$  à travers une PCoA (Figure 28) et d'une analyse multivariée d'observation en groupes (Figure 29) ne met pas en évidence de clusterisation d'échantillons correspondant aux mêmes conditions expérimentales.

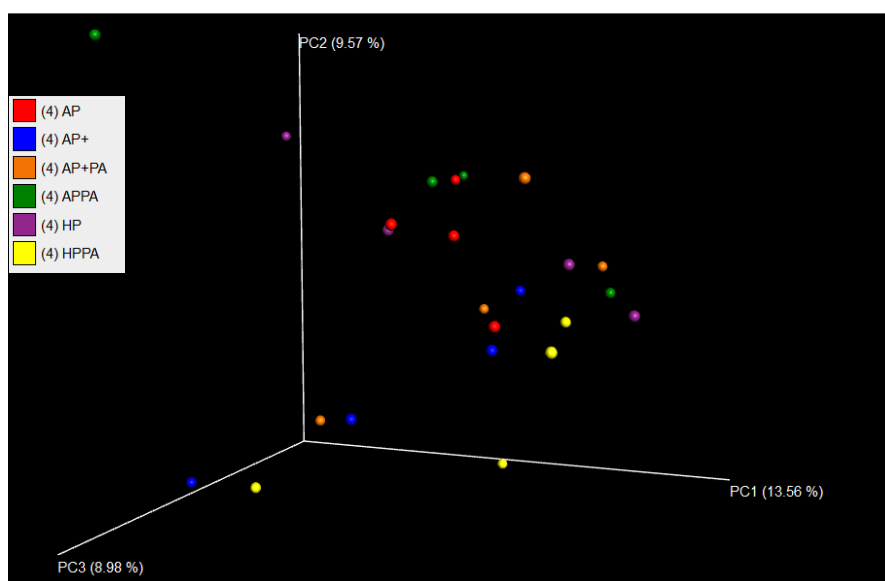


Figure 28 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de l'endosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.

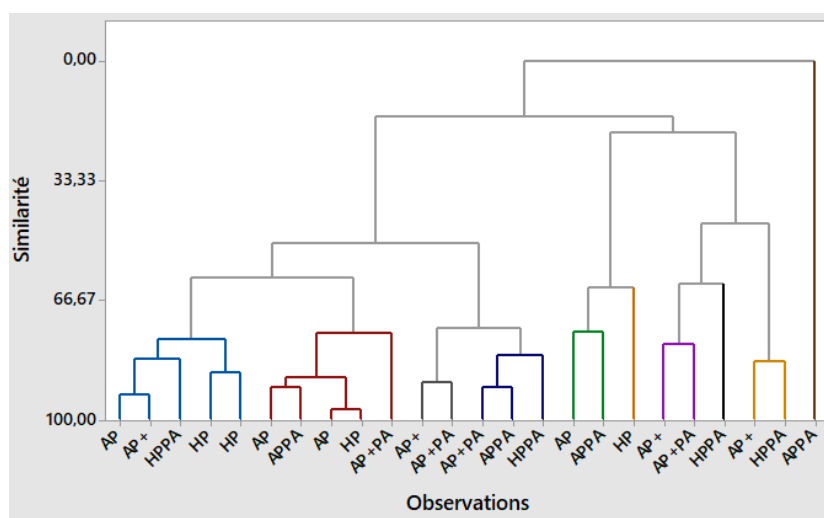


Figure 29 : Dendrogramme des similarités entre les échantillons de communautés fongiques de l'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*.

L'étude de la diversité  $\alpha$  souligne également une faible différenciation des échantillons (Tableau 7). En effet, aucune différence significative n'est observée pour l'indice de Shannon et Chao1. Des différences significatives sont malgré tout constatées au niveau des OTUs observés.

Tableau 7 : Tableau des indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon) des échantillons de communautés fongiques d'endosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatu*

Eau	Chao1				OTUs observés					Shannon				
	N	Moyenne	EcTyp	Groupe	N	Moyenne	EcTyp	Groupe		Eau	N	Moyenne	EcTyp	Groupe
AP	4	106,2	35,9	A	4	68,25	11,64	A		AP	4	4,61	0,507	A
AP+	4	71,55	6,68	A	4	50,5	4,65	A	B	AP+	4	4,245	0,397	A
AP+PA	4	69,6	22,2	A	4	52,75	7,93	A	B	AP+P	4	4,361	0,535	A
APPA	4	81	25,9	A	4	63	20,9	A	B	APPA	4	4,544	0,607	A
HP	4	85,42	13,11	A	4	64,25	4,57		B	HP	4	4,4	0,266	A
HPPA	4	72,4	32,5	A	4	46,75	9,39		C	HPPA	4	4,077	0,51	A

L'étude des taxons ne met en évidence aucun OTU présentant des différences significatives d'abondances relatives dans les comparaisons suivantes : AP et APPA, AP et HP, AP et AP+, APPA et HPPA, APPA et AP+PA.

### 5.3. Rhizosphère

#### 5.3.1. Communautés bactériennes

Tout d'abord, la répartition taxonomique est étudiée afin de mettre en évidence de potentielles divergences entre des paramètres expérimentaux (Figure 30). Celle-ci met d'abord en évidence une variété de phylums détectés. Également, des abondances relatives élevées de Protéobactéries sont observées dans tous les échantillons. Finalement, les échantillons semblent présenter des microbiotes relativement différenciés selon les conditions expérimentales.

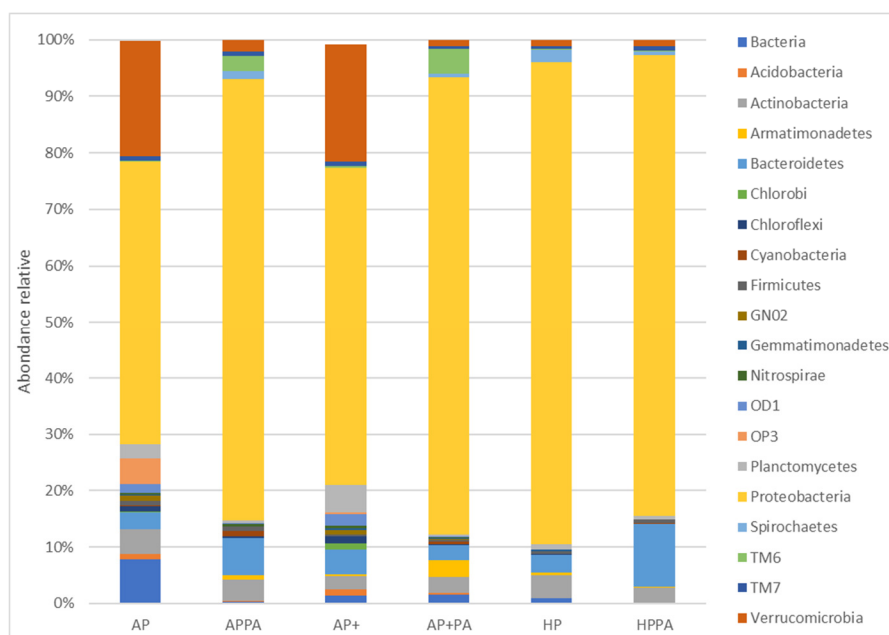


Figure 30 : Représentation de la répartition taxonomique de la population bactérienne de la rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*. Les phylums avec des abondances relatives inférieures à 0,5% dans tous les échantillons n'ont pas été intégrés à ce graphique.



L'analyse de la diversité  $\beta$  à travers une PCoA (Figure 31) montre les échantillons AP et APPA ainsi que AP+ et AP+PA sont bien différenciés tandis que cela n'est pas observé pour la paire HP et HPPA.

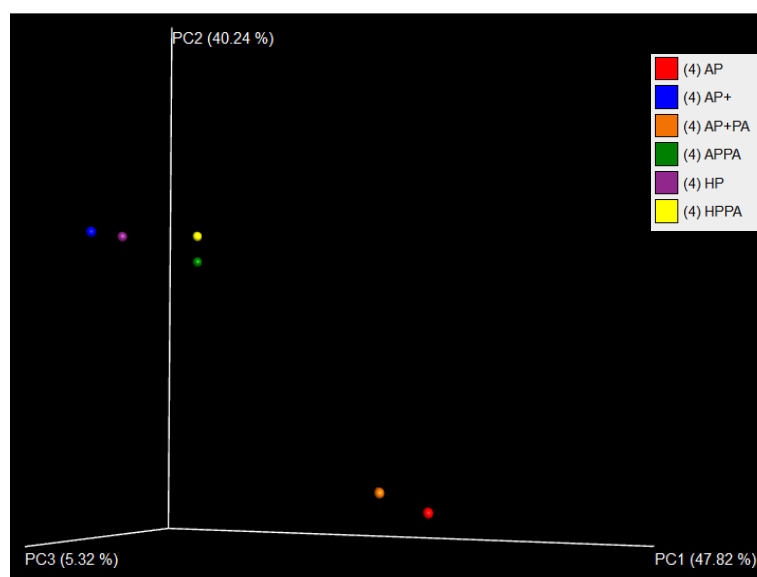


Figure 31 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de l'endosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.

Ensuite, la comparaison des indices de diversité  $\alpha$  permet d'établir des tendances quant à la diversité et la richesse des échantillons. En effet, AP+ présente une diversité plus élevée que les autres échantillons pour tous les indices calculés. De manière générale, l'inoculation par l'agent pathogène *P. aphanidermatum* semble avoir entraîné une baisse de diversité dans les échantillons.

Tableau 8 : Tableau des indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon, PD Whole tree) des échantillons de communautés bactériennes de rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum*.

Eau	N	Chao1	OTUs observés	Shannon	PD Whole tree
AP+	1	720,26	484	6,34	39,68
AP	1	537,18	379	6,07	33,52
APPA	1	474,52	324	5,66	25,19
AP+PA	1	381,00	271	5,72	21,59
HP	1	346,87	261	5,31	19,99
HPPA	1	316,00	227	5,19	18,59

Dans le cadre de l'étude des taxons qui sont présents en aquaponie et ne l'étant pas dans les autres eaux afin d'étudier les causes de l'effet suppressif observé en aquaponie, il est important de pouvoir établir des différences significatives d'abondances relatives de taxons. Cependant, un test statistique n'est pas applicable avec une seule observation. Ainsi, afin de tout de même pouvoir proposer des organismes qui pourraient être impliqués dans cet effet suppressif, il a été arbitrairement choisi d'exclure tous les taxons présents à moins de 0,1% et de ne garder que ceux présents plus de deux fois plus dans les eaux aquaponiques que dans les eaux hydroponiques ou aquaponiques complémentées.

Dès lors, en réalisant les mêmes comparaisons par paires que réalisées dans le cadre de la rhizoplane et de l'endosphère, 9 taxons répondaient aux conditions précitées en comparant AP à AP+ et HP, et 12 en comparant APPA à AP+PA et HPPA, dont un est commun à ces comparaisons (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des taxons de bactéries identifiés comme présentant des abondances relatives plus élevées en AP qu'en AP+ et HP ou en APPA qu'en AP+PA et HPPA.

Taxon identifié		Baisse d'abondance du taxon de AP vers AP+ et HP	Baisse d'abondance du taxon de APPA vers AP+PA et HPPA
Famille	Genre		
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i>	Oui	Non
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Methylibium</i>	Oui	Non
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	Oui	Non
<i>Patulibacteraceae</i>		Oui	Non
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	Oui	Non
<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zoogleae</i>	Oui	Non
<i>Sphingomonadaceae</i>		Oui	Non
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	Oui	Non
<i>Caldilineaceae</i>		<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
<i>Bdellovibrionaceae</i>	<i>Bdellovibrio</i>	Non	Oui
<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Sediminibacterium</i>	Non	Oui
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Trabulsiella</i>	Non	Oui
<i>Fimbriimonadaceae</i>	<i>Fimbriimonas</i>	Non	Oui
<i>Hyphomonadaceae</i>		Non	Oui
<i>Legionellaceae</i>		Non	Oui
<i>Leptospiraceae</i>	<i>Leptospira</i>	Non	Oui
<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Nitrospira</i>	Non	Oui
<i>Rhodocyclaceae</i>		Non	Oui
<i>Sinobacteraceae</i>	<i>Nevskia</i>	Non	Oui
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lysobacter</i>	Non	Oui

### 5.3.2. Communautés fongiques

L'analyse de la répartition taxonomique des communautés fongiques permet de mettre en évidence une certaine différenciation des échantillons (Figure 32). En effet, une forte augmentation d'abondance relative de Basidiomycètes est constatée en APPA par rapport à tous les autres échantillons. De plus, les abondances relatives de séquences uniquement assignées en tant que champignons varient entre 47 et 76% sauf pour APPA qui ne présente que 15% de séquences de ce type.

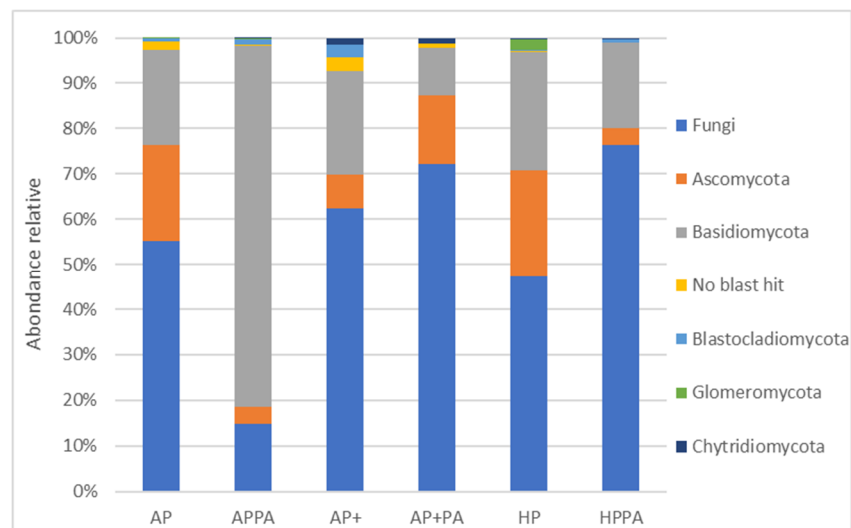


Figure 32 : Représentation de la répartition taxonomique de la population fongique de la rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum*.

L'analyse de diversité  $\beta$  à l'aide d'une PCoA (Figure 33) permet de mettre en évidence des différenciations entre les échantillons et particulièrement à la suite de l'inoculation de l'agent pathogène *P. aphanidermatum*.

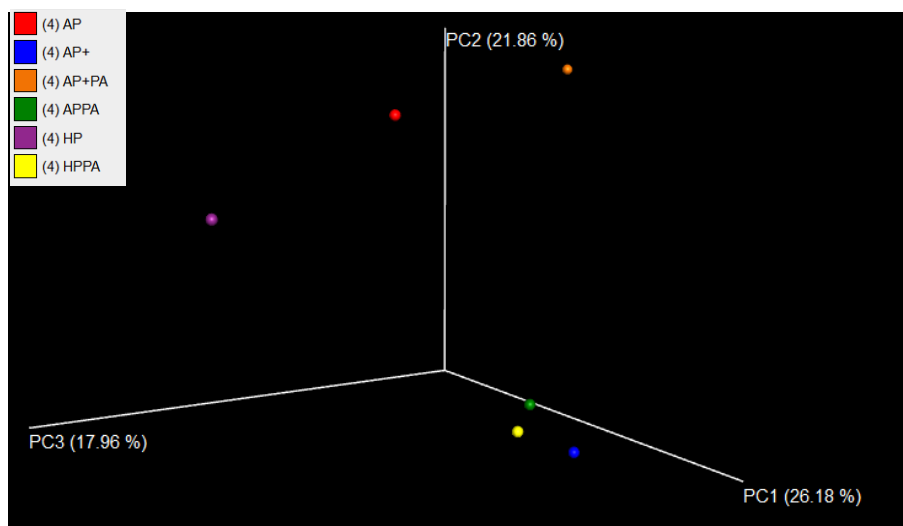


Figure 33 : Analyse en coordonnées principales de la  $\beta$ -diversité des échantillons de communautés fongiques de la rhizosphère. Rouge : AP, Bleu : AP+, Orange : AP+PA, Vert : APPA, Mauve : HP, Jaune : HPPA.

Ensuite, la comparaison des indices de diversité  $\alpha$  permet d'établir des tendances quant à la diversité et la richesse des échantillons Tableau 10. En effet, APPA présente une diversité globalement plus élevée que les autres tandis que AP est l'échantillon le moins diversifié.

Tableau 10 : Tableau des indices de diversité  $\alpha$  (Chao1, OTUs observés, indice de Shannon) des échantillons de communautés bactériennes de la rhizosphère selon le type d'eau et l'inoculation de l'agent pathogène *P.aphanidermatum*.

Eau	N	Chao1	OTUs observés	Shannon
APPA	1	199,00	172	5,14
AP+	1	177,38	154	2,41
AP+PA	1	174,55	159	5,22
HP	1	164,67	139	5,44
HPPA	1	157,00	148	4,68
AP	1	108,00	95	5,37

Pour finir, l'étude des taxons a permis de mettre en évidence 8 taxons présents en abondances plus élevées en AP qu'en AP+ et HP tandis que 4 taxons l'ont également plus été en APPA qu'en AP+PA et HPPA (Tableau 11). Cependant, aucun de ces taxons ne sont communs entre ces comparaisons.

Tableau 11 : Liste des taxons de champignons identifiés comme présentant des abondances relatives plus élevées en AP qu'en AP+ et HP ou en APPA qu'en AP+PA et HPPA

Taxon identifié		Baisse d'abondance du taxon de AP vers AP+ et HP	Baisse d'abondance du taxon de APPA vers AP+PA et HPPA
Famille	Genre		
<i>Helotiaceae</i>	<i>Rhizoscyphus</i>	Oui	Non
<i>Dermateaceae</i>	<i>Neofabraea</i>	Oui	Non
<i>Incertae sedis</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	Oui	Non
<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Cercospora</i>	Oui	Non
<i>Tremellaceae</i>	<i>Dioszegia</i>	Oui	Non
<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	Oui	Non
<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium</i>	Oui	Non
<i>Tulasnellaceae</i>		Oui	Non
<i>Incertae sedis</i>	<i>Rachicladospodium</i>	Non	Oui
<i>Incertae sedis</i>	<i>Acremonium</i>	Non	Oui
<i>Orbiliaceae</i>	<i>Monasporium</i>	Non	Oui
<i>Schizophyllaceae</i>	<i>Schizophyllum</i>	Non	Oui

## 6. Etude de l'essai *in vivo* 2

L'analyse de la variabilité au sein de l'essai *in vivo* 2 n'a pas été étudiée dans ce travail car ce dernier ne réunissait pas les conditions idéales pour tenter de mettre en évidence des agents antagonistes de *P. aphanidermatum*. En effet, les bacs de culture d'AP et AP+ ont développé une autre maladie causée par un autre agent phytopathogène. Dès lors, seule la comparaison entre les eaux aquaponiques et hydroponiques aurait été possible et semble donc moins robuste.

## VI. DISCUSSION

---

### 1. Evaluation des méthodes d'assignation taxonomique

Tout d'abord, lors de la comparaison des trois méthodes d'assignation taxonomique BLAST, UCLUST et RDP classifier, aucune différence n'a été observée entre ces méthodes quant à la taxonomie assignée aux différents OTUs. Dans les conditions testées, ces méthodes semblent ainsi présenter la même efficacité d'assignation taxonomique. Cela se révèle être contraire à ce que Bokulich *et al.* (2018) mettait en évidence où RDP présentait une meilleure efficacité que BLAST et UCLUST. Cependant, cette étude a également investigué l'optimisation de ces méthodes d'assignation taxonomique et a utilisé ces paramètres optimisés pour la comparaison de l'efficacité de ces méthodes (Bokulich *et al.*, 2018). Or, les paramètres utilisés dans cette évaluation ont été ceux configurés par défaut dans QIIME, cela ayant également pu entraîner son lot de divergences. Une optimisation des paramètres aurait pu ainsi être effectuée afin d'essayer de rencontrer les résultats obtenus par Bokulich *et al.* (2018).

Ensuite, l'évaluation des méthodes d'assignation taxonomique révèle des différences par rapport à la taxonomie attendue. En effet, un taxon n'est pas observé et les abondances relatives ne correspondent pas à ce qui est attendu. Cela peut s'expliquer par le fait que lors de l'exécution du script `join_paired_ends.py` qui apparie les *reads forward* et *reverse*, une partie non négligeable des séquences n'étaient pas appariées même lorsque la longueur minimale de la superposition requise pour l'appariement des *reads* était fixée à la valeur minimale possible (1 base). Dès lors, une partie des séquences n'étaient plus prises en compte pour la suite de l'analyse, ayant un impact sur les abondances relatives observées et provoquant la non détection d'un taxon. La prise en compte des séquences rejetées serait ainsi une piste d'amélioration quant à l'efficacité du plan de travail d'analyse bioinformatique.

Cette *mock community* avait déjà été utilisée par Bokulich *et al.* (2018) et fait partie du projet mockrobiota (Bokulich *et al.*, 2016), où aucun problème n'avait été identifié pour cette étape de l'analyse. Cependant, cette étude avait réalisé le traitement de ses données brutes sur la plateforme QIIME 2 même si l'assignation taxonomique était réalisée sur QIIME 1.9.1, cela pouvant également être une piste d'amélioration du protocole afin améliorer l'efficacité de ces étapes.

Finalement, en considérant le fait que l'évaluation réalisée aurait dû permettre de décider des méthodes d'assignation taxonomique utilisées dans le plan de travail, les conclusions tirées par Bokulich *et al.* (2018) ont été privilégiées. Par conséquent, la méthode RDP classifier sera employée pour les données de séquençage d'ARNr 16S tandis que la méthode BLAST pour les données de séquençage d'ITS (Bokulich *et al.*, 2018).

### 2. Ajout du *read 1*

Pour commencer, l'ajout du R1 n'influence pas de la même manière l'analyse bioinformatique s'il s'agit de la région V1-V3 de l'ARNr 16S ou de l'ITS1.

En effet, il est observé que cet ajout contribue positivement aux trois facteurs employés : le nombre de séquences par échantillon, le nombre de phylums détectés ainsi qu'aux indices diversité  $\alpha$  des échantillons. Dès lors, cet ajout devrait permettre d'identifier une plus large gamme d'organismes et de réaliser une analyse plus complète. Cependant, pareil constat n'est pas réalisé dans le cas de l'ITS car ces trois facteurs ne montrent pas d'amélioration significative dans le cas de l'analyse réalisée. Malgré cela, une diminution du nombre de séquences non assignée est observée (de 90,50% à 88,62%). Cela implique que même si une augmentation significative du nombre de séquences par échantillon n'est pas observée, de nouvelles séquences sont ajoutées et qu'une partie de celles-ci sont taxonomiquement assignées et permettent de diminuer la proportion de séquences non assignées.

Cette différence de nombre de séquences gagnées entre la région V1-V3 de l'ARNr 16 et l'ITS peut s'expliquer par la taille des régions amplifiées. En effet, l'ITS1 mesure  $208 \pm 56$  paires de bases (Porrás-Alfaro *et al.*, 2014). Le séquençage générant des *reads* de 250 bases, il ne devrait pas y avoir de cas où l'appariement des *reads* ne se produit pas, ceci explique ainsi le faible nombre de séquences supplémentaires observées ainsi que l'absence de différences significatives au niveau des facteurs étudiés. Concernant la région V1-V3, celle-ci mesure environ 500 paires de bases. Dès lors, le séquençage étant limité à deux fois 250 paires de bases, il est possible que ces séquences ne présentent pas suffisamment de superpositions et soient rejetées lors de l'exécution du script `multiple_join_paired_ends.py`. Dès lors, cela expliquerait l'augmentation très hautement significative des nombres de séquences et de la diversité au sein des différents échantillons.

De plus, l'étude métagénomique de communautés microbiennes de différents compartiments aquaponiques a déjà été réalisée à l'aide d'uniquement les *reads forward* de la région V1-V3 par Schmautz *et al.* (2017) et ce avec les mêmes amorces qu'utilisées dans cette étude. Au niveau de l'assignation taxonomique, cette étude a détecté 42 phylums et a permis de faire ressortir plusieurs différences significatives au niveau de taxons assignés jusqu'au genre (Schmautz *et al.*, 2017). Cela montre que l'analyse métagénomique de communautés bactériennes à l'aide uniquement de la moitié du matériel génétique reste possible et permet de réaliser une analyse taxonomique performante. Dès lors, ajouter les *reads forward* non appariés aux *reads forward* et *reverse* appariés ne devrait pas nuire à la performance de l'analyse des données de séquençage haut-débit.

Suite à ces observations, l'ajout du R1 sera considéré pour tous les échantillons, 16S et ITS, dans la suite des analyses.

### **3. Culture pure de *Pseudomonas chlororaphis***

L'analyse de la répartition taxonomique des différentes cultures pures révèle que d'autres séquences que l'ARNr 16S ont été amplifiées. En effet, celles-ci n'étaient pas reconnues par la base de données Silva mais une analyse par BLASTn et une comparaison à des bases de données autres que d'ARNr 16S a permis de les identifier comme faisant partie du génome de *P. chlororaphis*. Le fait que d'autres régions soient amplifiées signifie ainsi que les amorces utilisées sont capables de s'hybrider à d'autres endroits du génome et d'en permettre l'amplification lors de la PCR.

De plus, seules les 10 séquences non assignées majoritaires ont fait l'objet d'une analyse BLAST. Cependant, il reste possible que d'autres séquences parmi ces dernières appartiennent également au génome de *P. chlororaphis*, il n'est donc pas à exclure que ces abondances relatives soient en réalité plus élevées.

De plus, des séquences d'autres organismes ont été identifiées dans ces échantillons. Ces organismes peuvent ainsi avoir diverses sources comme une contamination lors de la réalisation de la culture pure ou lors des étapes d'extraction ADN et d'amplification PCR (Kratat *et al.*, 2017). Cependant, la relativement faible représentation de ces organismes combiné au fait qu'ils ne soient pas systématiquement présents dans tous les échantillons de culture pure indique qu'il s'agirait plus probablement d'une contamination ponctuelle et non systématique.

#### **4. Evaluation des différences entre les deux expérimentations *in vivo***

D'un premier point de vue, l'analyse de la beta diversité de l'endosphère permet d'assurer que les microbiotes des essais *in vivo* ont été influencés de manière différente et qu'une analyse séparée de ces deux essais permettrait d'effacer ce biais et de mieux pouvoir observer les différences dont la cause est liée aux paramètres expérimentaux. Cette remarque est également valable pour les échantillons de rhizosphère même si certains échantillons ne sont pas clusterisés dans les bons groupes.

Pour la rhizoplane, bien que des échantillons appartenant aux mêmes essais *in vivo* soient observés en groupe et que le test statistique Adonis révèle une différence hautement significative entre les deux essais *in vivo*, certains échantillons comme ceux d'HP et d'HPPA de l'essai 2 sont proches de ceux de l'essai 1. Cela peut s'expliquer par le fait que contrairement aux eaux AP et AP+, l'eau HP avait la même composition en termes de minéraux mais aussi en termes de microbiote car celle-ci était stérilisée avant d'être en contact avec les plantes. Cependant, cette tendance n'est pas observée dans le cas de la rhizosphère, les microbiotes des eaux hydroponiques se sont ainsi différenciés d'un essai *in vivo* à l'autre malgré leurs compositions initiales identiques. Aussi, les ressemblances au niveau de la rhizoplane pourraient être dues à la variabilité de l'essai *in vivo* 2 qui semble être plus importante par rapport à l'essai *in vivo* 1 et qui, par hasard, les place dans la même zone du PCoA (Figure 12).

#### **5. Etude de l'essai *in vivo* 1**

L'étude des communautés bactériennes à travers trois microbiotes, la rhizoplane, l'endosphère et la rhizosphère et de l'inoculation d'un pathogène, *P. aphanidermatum*, permet d'évaluer les effets qu'aura chacun de ces paramètres expérimentaux ainsi que leurs combinaisons sur le microbiote. De plus, cela devrait également rendre possible l'identification de potentiels agents antagonistes de *P. aphanidermatum*. Ces derniers étant supposés être présents en abondances plus élevées dans les eaux aquaponiques où un effet suppressif a été constaté.

##### **5.1. Communautés bactériennes**

Tout d'abord, les communautés bactériennes se sont clairement différenciées au niveau de la rhizoplane. En effet, on observe un groupe composé des échantillons d'AP et APPA, l'eau

aquaponique a ainsi été très peu affectée par l'inoculation de l'agent pathogène, supposément car celle-ci contenait au préalable le microbiote nécessaire pour y faire face.

De plus, une autre hypothèse comme quoi le microbiote d'une eau aquaponique qui a été complémenté est déséquilibré à la suite de cette complémentation est vérifiée. En effet, en plus de présenter un profil bactérien différent d'AP, AP+ est significativement moins diversifié que AP. De plus, contrairement à AP, quand AP+ est inoculé avec l'agent pathogène, un décalage important se produit dans son microbiote, montrant ainsi que AP+ ne dispose pas des défenses naturelles d'AP.

Dans l'analyse de l'endosphère, il est possible d'effectuer un lien entre la maladie induite par l'agent pathogène au niveau de la diversité  $\beta$ . En effet, le microbiote endophytique des laitues qui ont développé les symptômes d'une infection par *P. aphanidermatum* (AP+PA et HPPA) présentent une clusterisation très nette tandis que tous les autres échantillons non infectés présentent une grande variabilité empêchant toute observation en groupe (Figure 25). Ainsi, en s'attaquant aux racines, *P. aphanidermatum* a probablement également provoqué un décalage dans les communautés bactériennes endophytiques de AP+PA et HPPA. De même, il semblerait que le microbiote endophytique soit plus susceptible d'être influencé par l'inoculation du pathogène que par l'eau irriguant les racines de la laitue. En effet, aucune tendance influencée par le type d'eau n'est observable.

Dans le cas de la rhizosphère, l'effet de *P. aphanidermatum* semble moins marqué. En effet, l'analyse de la diversité  $\beta$  ne met pas en évidence de similarités entre les échantillons ayant été infectés par l'agent pathogène. Toutefois, il aurait pu être attendu que *P. aphanidermatum* provoque un *shift* dans les communautés bactériennes de la rhizosphère en considérant le fait que les zoospores de ce dernier se propagent dans celle-ci.

Ensuite, les abondances relatives des taxons ont permis de mettre en évidence des taxons étant significativement présents en abondances plus importantes lorsque l'eau de culture était aquaponique que lorsqu'elle était hydroponique ou aquaponique complémentée. Ces différences n'ont toutefois été constatées que dans la rhizosphère et la rhizoplane, l'endosphère présentant peu de variations en termes d'assignation taxonomique et de diversités  $\alpha$  et  $\beta$ .

Dans la rhizoplane, 36 taxons ont été mis en évidence dont 12 présentent à la fois des abondances relatives plus élevées en AP et APPA que dans les autres conditions expérimentales. On retrouve ainsi 12 taxons présents initialement dans l'eau aquaponique et qui gardent des abondances relatives importantes après l'attaque du pathogène. Ces taxons pourraient ainsi jouer un rôle dans les mécanismes de défenses contre ce dernier. À contrario, les organismes qui étaient présents avant l'attaque du pathogène et qui ne le sont plus, sont eux moins susceptibles d'être impliqués dans un phénomène de suppression. Ce raisonnement peut également être appliqué aux organismes qui ne présentaient pas de différences significatives et qui en présentent après infection par l'agent pathogène, ces derniers étant susceptibles d'avoir augmenté en population pour s'opposer à l'agent pathogène. Ainsi, parmi les 36 taxons, un intérêt particulier sera accordé aux taxons étant constatés avant et après inoculation ainsi qu'à ceux uniquement observés après inoculation.



Parmi ces genres (Tableau 4) certains taxons pourraient présenter des activités de biocontrôle. En effet, le genre *Sphingobium*, bien que comprenant des organismes pouvant également être pathogéniques, contient des espèces telles que *S. mellinum* qui ont déjà été mises en évidence comme pouvant effectuer des activités de biocontrôle (van Bruggen, Francis and Jochimsen, 2014). De même, le genre *Agrobacterium* est composé de nombreux pathogènes des plantes mais certains organismes peuvent également présenter des activités de biocontrôle comme l'antibiose (Pal and McSpedden Gardener, 2006). Le genre *Microbacterium* a également des agents de biocontrôle dont *M. oleovorans*, agent de biocontrôle de *Fusarium verticilloides* (Sartori, Nesci and Etcheverry, 2012). *Azospirillum* est un PGPB très étudié capable de coloniser beaucoup d'espèces de plantes, il exerce aussi une variété de mécanismes comme la fixation de l'azote et la production de phytohormones mais peut aussi limiter la prolifération des agents phytopathogènes (Tortora, Diaz-Ricci and Juan C, 2011). Le genre *Bdellovibrio* pourrait également être une piste d'agent de biocontrôle puisque ce dernier peut effectuer des actions de prédation en s'attaquant notamment aux bactéries de la rhizosphère (Damron and Barbier, 2013; Olanya and Lakshman, 2015). Finalement, le genre *Haliangium* de la famille des *Haliangiaceae* pourrait également faire partie de l'effet suppressif observé en aquaponie car celui-ci est capable de produire des composés antibiotiques inhibant le développement de nombreux champignons (Kundim *et al.*, 2003).

Certains taxons ont quant à eux été mis en évidence dans des environnements suppressifs mais sans avoir pu les relier à des activités suppressives comme la famille des *Cytophagaceae* (Mendes *et al.*, 2018), le genre *Luteimonas* de la famille de *Xanthomonadaceae* (Xiao *et al.*, 2017) et le genre *Ramlibacter* de la famille des *Comamonadaceae* (Bonanomi *et al.*, 2018). D'autres de ces taxons sont soit des bactéries impliquées dans le phénomène de nitrification (Planctomyces (Kong *et al.*, 2017), *Hyphomicrobium* (Sugita, Nakamura and Shimada, 2005) ou présentes dans les environnements aquatiques (*Saprospiraceae* (Xia *et al.*, 2008), *Hyphomonadaceae* (Abraham and Rohde, 2014)) mais sans activité de biocontrôle recensées. Ainsi, une majorité de ces taxons ne sont pas connus comme présentant des activités de biocontrôle ni comme pouvant promouvoir la croissance de la plante.

Parmi les 36 taxons bactériens mis en évidence dans la rhizoplane, six d'entre eux sont, sur base de la littérature, capables d'exercer des activités antagonistes contre d'autres bactéries et champignons : *Sphingobium*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Azospirillum*, *Bdellovibrio* et *Haliangiaceae*.

Au-delà de la rhizoplane, plusieurs taxons avaient également été mis en évidence dans la rhizosphère (Tableau 9).

Parmi ces taxons, le genre *Rhodococcus* contient des espèces telles que *R. erythropolis* capable de déstabiliser la communication basée sur le *quorum sensing* de bactéries pathogènes (reviewé par Latour *et al.*, 2013). Un autre taxon important est *Lysobacter*, ce dernier est d'un grand intérêt puisque l'efficacité de *L. enzymogenes* a déjà été évaluée contre *P. aphanidermatum* et a démontré des activités antagonistes en conditions *in vitro*. *L. enzymogenes* serait ainsi capable de produire des composés antifongiques mais lors d'une expérience *in vivo* sur de la culture hydroponique de concombre ce dernier n'a pas montré de suppression de la maladie (Folman *et al.*, 2004). *Bdellovibrio* est également retrouvé dans la rhizosphère, renforçant ainsi

l'hypothèse de son implication dans l'effet suppressif observé. Finalement, *Pseudomonas* est également observé et est un genre bactérien particulièrement étudié pour ses activités de contrôle biologique dans la rhizosphère (Whipps, 2001).

Pour résumer, l'analyse des taxons a permis de mettre en avant six taxons dans la rhizoplane et quatre taxons dans la rhizosphère, dont un commun aux deux microbiomes, qui pourraient participer à l'effet suppressif observé en aquaponie.

## 5.2. Communautés fongiques

Tout d'abord, les communautés fongiques semblent être moins affectées par les conditions expérimentales que les communautés bactériennes. En effet, dans la rhizoplane et son analyse par la PCoA (Figure 22), les communautés fongiques présentent des distances entre échantillons plus élevées et une clusterisation en groupe est ainsi plus compliquée. Ensuite, il était observé dans l'endosphère des populations bactériennes une différenciation des échantillons d'AP+PA et d'HPPA probablement due à l'infection provoquée par *P. aphanidermatum*. Cependant, ce constat n'est pas vérifié dans le cas des communautés fongiques endophytes puisque les échantillons se clusterisent comme si aucun paramètre expérimental n'avait été appliqué aux racines des laitues., il n'y a donc pas de tendance au groupement de AP+PA et HPPA

Comme dans le cas des communautés bactériennes, l'étude des différences significatives au niveau des abondances relatives des taxons devrait permettre de mettre en évidence des taxons qui pourraient jouer un rôle dans l'effet suppressif rencontré en aquaponie.

Lorsque cette comparaison était réalisée dans la rhizoplane, contrairement aux communautés bactériennes où de nombreux taxons étaient retenus, seuls trois l'ont été pour les communautés fongiques : *Catenaria*, *Pseudozyma prolifica* et *Hysterium pulicare*.

Le genre *Catenaria* est composé d'espèces comme *C. anguillulae* qui est un agent de biocontrôle endoparasitique de nématodes (Singh *et al.*, 2013). Ensuite, le genre *Pseudozyma* représente un groupe de levures dont *P. flocculosa* connu comme agent de biocontrôle avec une activité particulière contre les champignons grâce à la flocculosine qu'il synthétise (Marchand *et al.*, 2009). Finalement, le taxon *Hysterium pulicare* désigne un champignon libre non lichénisé pouvant se développer sur le chêne (Coste, 2014), taxon inattendu dans une eau aquaponique. Ainsi, deux taxons pouvant jouer un rôle dans l'effet suppressif ont été identifiés : *Catenaria* et *Pseudozyma*.

Finalement, aucune différence significative d'abondances de taxon n'était observée dans l'endosphère mais des taxons avaient été mis en évidence dans la rhizosphère (Tableau 11). Parmi ces taxons, plusieurs d'entre eux comme *Pyrenochaeta* (Vanachter, Van Wambeke and Van Assche, 1988), *Cercospora* (Tessmann, Charudattan and Preston, 2008), *Aspergillus* (Stevens *et al.*, 2000) et *Neofabreae* (Chen *et al.*, 2016) s'avèrent être de potentiels agents pathogènes sans qu'il soit fait état de potentielles activités antagonistes dans la littérature scientifique. Malgré la présence de ces agents pathogènes, *Penicillium*, un taxon pouvant être également pathogène mais aussi exercer des activités antagonistes contre les champignons pathogènes des plantes via la production de substances antifongiques est rencontré dans cette liste de taxons (Yang *et al.*, 2008). Cependant, même si plus d'organismes potentiellement

pathogéniques que bénéfiques ont été mis en évidence dans le cas des communautés fongiques, il reste important de tenir compte des proportions importantes de séquences non assignées chez les champignons. Par conséquent, des organismes étant présents en abondances significativement plus importantes en eaux aquaponiques ont potentiellement pu jouer un rôle dans l'effet suppressif mais n'ont pas pu être identifiés avec les bases de données actuelles.

## VII. CONCLUSION

---

### 1. Amélioration du plan de travail d'analyse bioinformatique

La première partie de cette étude s'est focalisée sur l'amélioration du plan de travail utilisé lors de l'analyse bioinformatique sous QIIME à travers l'évaluation de différentes méthodes d'assignation taxonomique et la prise en compte de *reads* perdus lors de l'exécution du script `join_paired_ends.py`.

Premièrement, l'évaluation de méthodes d'assignation taxonomique n'a pas permis de mettre en évidence de méthode présentant de meilleures performances contrairement à ce que Bokulich *et al.* (2018) parvenait à réaliser. De plus, certains organismes n'étaient pas représentés et les autres n'étaient pas observés dans les abondances relatives attendues. Il a également été constaté une perte de séquences lors de l'exécution du script `join_paired_ends.py`. Ainsi, il serait intéressant de réévaluer l'efficacité de ces méthodes avec des paramètres optimisés pour celles-ci ainsi que d'évaluer si l'appariement des *reads forward* et *reverse* n'entraîne pas la perte de séquences sur QIIME 2.

Deuxièmement, l'évaluation de l'ajout des *reads forward* rejetés aux *reads forward* et *reverse* appariés a mis en évidence que celui-ci augmentait de manière très hautement significativement le nombre de séquences pour la suite de l'analyse bioinformatique. De même, cet ajout augmente de nombre de phylums observés de 17 à 31 dans le cas de la rhizoplane de communautés bactériennes. Cet ajout permet ainsi d'observer une diversité accrue d'individus et de réaliser une analyse plus complète.

### 2. Analyse des essais in vivo

Après cette partie d'amélioration du protocole d'analyse bioinformatique, les échantillons de l'analyse in vivo ont été analysés en tenant compte des résultats de ces étapes précédentes.

Dans un premier temps une comparaison entre les essais in vivo 1 et 2 a été réalisée afin d'évaluer si une analyse conjointe des deux essais est réalisable. Des différences significatives ont été observées pour les trois microbiomes échantillonnés, indiquant un biais lié aux essais in vivo si une analyse conjointe était réalisée.

Ensuite, l'essai in vivo 1 a été analysé et une différenciation très marquée des microbiotes au niveau de la rhizoplane a été observée. Cela permet de renforcer l'hypothèse que l'aquaponie présente un effet suppressif et que l'eau aquaponique perd cet effet suppressif si elle est complémentée en nutriments. L'analyse des différences d'abondances relatives de taxons entre

les différentes conditions expérimentale a permis de mettre en évidence des taxons qui pourraient jouer un rôle dans l'effet suppressif rencontré en aquaponie : *Sphingobium*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Azospirillum*, *Bdellovibrio*, *Haliangiaceae*, *Rhodococcus*, *Lysobacter* et *Pseudomonas* pour les communautés bactériennes et *Catenaria*, *Pseudozyma* et *Penicillium* pour les communautés fongiques.

### **3. Perspectives**

Une des premières choses qui pourrait être faite dans la continuité de cette étude est l'analyse de l'essai *in vivo* 2. En effet, même si une partie des échantillons avaient été infectés par un autre agent pathogène, il reste toutefois possible de vérifier si les taxons mis en évidence par cette étude sont également observés dans les différents microbiotes aquaponiques de ce deuxième essai *in vivo*.

Ensuite, compte tenu du fait que les taxons proposés n'ont pour la plupart pas été observés en aquaponie, il serait important d'essayer d'isoler par des méthodes spécifiques ces taxons. Cela permettrait dans un premier temps de confirmation l'observation de ces taxons à la suite de l'analyse bioinformatique mais aussi d'évaluer si ces taxons présentent bel et bien des mécanismes d'antagonisme vis-à-vis de *P. aphanidermatum*.

## VIII. BIBLIOGRAPHIE

---

- Abraham, W.-R. and Rohde, M. (2014) 'The family Hyphomonadaceae', *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 9783642301, p. v. doi: 10.1007/978-3-642-30197-1.
- Albright, L. D. *et al.* (2007) *Root Disease Treatment Methods for Commercial Production of Hydroponic Spinach*.
- Almeida, A. *et al.* (2018) 'Benchmarking taxonomic assignments based on 16S rRNA gene profiling of the microbiota from commonly sampled environments', *GigaScience*. Oxford University Press, 7(5), pp. 1–10. doi: 10.1093/gigascience/giy054.
- Altschup, S. F. *et al.* (1990) 'Basic Local Alignment Search Tool', *Journal of Molecular Biology*, 215, pp. 403–410.
- Antoniou, A. *et al.* (2017) 'Rhizosphere Microbiome Recruited from a Suppressive Compost Improves Plant Fitness and Increases Protection against Vascular Wilt Pathogens of Tomato', *Frontiers in Plant Science*, 8(November), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2017.02022.
- Arana, I. *et al.* (1999) 'Chlorination and ozonation of waste-water: Comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes', *Journal of Applied Microbiology*, 86(5), pp. 883–888. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00772.x.
- Arndt, R. E. and Wagner, E. J. (2003) 'Filtering *Myxobolus cerebralis* Triactinomyxons from contaminated water using rapid sand filtration', *Aquacultural Engineering*, 29(3–4), pp. 77–91. doi: 10.1016/j.aquaeng.2003.05.001.
- Bazyar Lakeh, A. A. *et al.* (2013) 'Low frequency ultrasound and UV-C for elimination of pathogens in recirculating aquaculture systems', *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier B.V., 20(5), pp. 1211–1216. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.01.008.
- Bokulich, N. A. *et al.* (2016) 'mockrobiota : a Public Resource for Microbiome Bioinformatics Benchmarking', *Bioinformatics*, 1(5), pp. 1–7. doi: 10.1128/mSystems.00062-16.Editor.
- Bokulich, N. A. *et al.* (2018) 'Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin', *Microbiome*. Microbiome, 6(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s40168-018-0470-z.
- Boller, M. A. and Kavanaugh, M. C. (1995) 'Particle characteristics and headloss increase in granular media filtration', *Water Research*, 29(4), pp. 1139–1149. doi: 10.1016/0043-1354(94)00256-7.
- Bonanomi, G. *et al.* (2018) 'Conventional farming impairs *Rhizoctonia solani* disease suppression by disrupting soil food web', *Journal of Phytopathology*, 166(9), pp. 663–673. doi: 10.1111/jph.12729.
- Bouhssini, M. El and Trissi, A. N. (2019) 'Integrated Pest Management : Economic Threshold and Economic Injury Level', in *Date Palm Pests and Diseases Integrated Management Guide*. ICARDA, pp. 14–19.
- Brooks, J. P. *et al.* (2015) 'The truth about metagenomics: Quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies Ecological and evolutionary microbiology', *BMC Microbiology*, 15(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12866-015-0351-6.

- van Bruggen, A. H. C., Francis, I. M. and Jochimsen, K. N. (2014) 'Non-pathogenic rhizosphere bacteria belonging to the genera *Rhizorhapis* and *Sphingobium* provide specific control of lettuce corky root disease caused by species of the same bacterial genera', *Plant Pathology*, 63(6), pp. 1384–1394. doi: 10.1111/ppa.12212.
- Camacho, C. *et al.* (2009) 'BLAST+: Architecture and applications', *BMC Bioinformatics*, 10, pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Caporaso, J. G., Bittinger, K., *et al.* (2010) 'PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment', *Bioinformatics*, 26(2), pp. 266–267. doi: 10.1093/bioinformatics/btp636.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., *et al.* (2010) 'QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data', *Natural Methods*, 7(5), pp. 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.QIIME.
- Cayanan, D. F. *et al.* (2009) 'Efficacy of chlorine in controlling five common plant pathogens', *HortScience*, 44(1), pp. 157–163.
- Chakravorty, S. *et al.* (2007) 'A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria', *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), pp. 330–339. doi: 10.1016/j.mimet.2007.02.005.
- Chao, A. and Chiu, C.-H. (2016) 'Nonparametric Estimation and Comparison of Species Richness', *eLS*, pp. 1–11. doi: 10.1002/9780470015902.a0026329.
- Chen, C. *et al.* (2016) 'Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezizula*, and related genera', *Fungal Biology*. Elsevier Ltd, 120(11), pp. 1291–1322. doi: 10.1016/j.funbio.2015.09.013.
- Cho, M. *et al.* (2010) 'Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants', *Water Research*. Elsevier Ltd, 44(11), pp. 3410–3418. doi: 10.1016/j.watres.2010.03.017.
- Cohen, A. *et al.* (2018) 'Combined Fish and Lettuce Cultivation: An Aquaponics Life Cycle Assessment', *Procedia CIRP*. Elsevier B.V., 69(2018), pp. 551–556. doi: 10.1016/j.procir.2017.11.029.
- Cook, R. J. and Baker, K. F. (1983) *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Coste, C. (2014) *Flore et végétation de l'Île de la Glère*.
- Cruaud, P. *et al.* (2014) 'Influence of DNA extraction method, 16S rRNA targeted hypervariable regions, and sample origin on microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), pp. 4626–4639. doi: 10.1128/AEM.00592-14.
- Damron, F. H. and Barbier, M. (2013) 'Predatory bacteria: Living Antibiotics, Biocontrol Agents, or Probiotics?', *Postdoc Journal*, (January 2015). doi: 10.14304/surya.jpr.v1n12.2.
- Delaide, B. *et al.* (2016) 'Lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Sucre*) Growth Performance in Complemented Aquaponic Solution Outperforms Hydroponics', *WaterWater*, 8(467), pp. 1–11. doi: 10.3390/w8100467.
- Delaide, B. *et al.* (2017) 'Plant and fish production performance, nutrient mass balances, energy and water use of the PAFF Box, a small-scale aquaponic system', *Aquacultural Engineering*. Elsevier B.V., 78(2017), pp. 130–139. doi: 10.1016/j.aquaeng.2017.06.002.

- Delaide, B. *et al.* (2019) 'Aerobic and anaerobic treatments for aquaponic sludge reduction and mineralisation', in Goddek, S. *et al.* (eds) *Aquaponics Food Production Systems*. Springer Cham, pp. 247–266.
- Deutschbauer, A. M., Chivian, D. and Arkin, A. P. (2006) 'Genomics for environmental microbiology', *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), pp. 229–235. doi: 10.1016/j.copbio.2006.04.003.
- Eck, M. *et al.* (2019) 'Exploring Bacterial Communities in Aquaponic Systems', *Water*, 11, p. 260. doi: 10.3390/w11020260.
- Edgar, R. C. (2010) 'Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST', *Bioinformatics*, 26(19), pp. 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Endo, M. (2019) *Plant Factory using Artificial Light*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-813973-8.00032-4.
- Expósito, R. G. *et al.* (2017) 'Current insights into the role of Rhizosphere bacteria in disease suppressive soils', *Frontiers in Microbiology*, 8, pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2017.02529.
- FAO (2016) *A scheme and training manual on good agricultural practices (GAP) for fruits and vegetables*. Bangkok.
- FAO (2019) *Sustainable Food and Agriculture, Integrated Aquaculture and Aquaponics*. Edited by C. Campagnhola and S. Pandey. The Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO). doi: 10.1016/B978-0-12-812134-4.00028-5.
- Folman, L. B. *et al.* (2004) 'Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber', *Biological Control*, 31(2), pp. 145–154. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.03.008.
- Forchino, A. A. *et al.* (2017) 'Aquaponics and sustainability: The comparison of two different aquaponic techniques using the Life Cycle Assessment ( LCA )', *Aquacultural Engineering*. Elsevier B.V., 77(2017), pp. 80–88. doi: 10.1016/j.aquaeng.2017.03.002.
- Goddek, S. *et al.* (2015) 'Challenges of sustainable and commercial aquaponics', *Sustainability*, 7, pp. 4199–4224. doi: 10.3390/su7044199.
- Goddek, S. *et al.* (2016) 'Navigating towards Decoupled Aquaponic Systems : A System Dynamics Design Approach', *Water*, 8(303), pp. 1–29. doi: 10.3390/w8070303.
- Goddek, S. *et al.* (2019) 'Decoupled Aquaponics Systems', in *Aquaponics Food Production Systems*, pp. 201–228.
- Graber, A. and Junge, R. (2009) 'Aquaponic Systems : Nutrient recycling from fish wastewater by vegetable production', *Desalination*. Elsevier B.V., 246(2009), pp. 147–156. doi: 10.1016/j.desal.2008.03.048.
- Gravel, V. *et al.* (2015) 'Fish effluents promote root growth and suppress fungal diseases in tomato transplants', *Canadian Journal of Plant Science*, 95(2015), pp. 427–436. doi: 10.4141/cjps-2014-315.
- Guchi, E. (2015) 'Review on Slow Sand Filtration in Removing Microbial Contamination and Particles from Drinking Water', *American Journal of Food and Nutrition*, 3(2), pp. 47–55. doi: 10.12691/ajfn-3-2-3.

- Hayden, A. L. (2006) 'Aeroponic and hydroponic systems for medicinal herb, rhizome, and root crops', *HortScience*, 41(3), pp. 536–538.
- Hijnen, W. A. M. *et al.* (2004) 'Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by.pdf', *Water Science and Technology*, 50(1), pp. 147–154.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. and Medema, G. J. (2006) 'Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review', *Water Research*, 40(1), pp. 3–22. doi: 10.1016/j.watres.2005.10.030.
- Hong, C. X. and Moorman, G. W. (2005) 'Plant pathogens in irrigation water: Challenges and opportunities', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(3), pp. 189–208. doi: 10.1080/07352680591005838.
- Huisman, L. and Wood, W. E. (1974) *Slow sand filtration*, World Health Organization, Geneva.
- Jackson, R. M. (1965) 'Antibiosis and fungistasis of soil microorganisms', in Baker, K. F. and Snyder, W. C. (eds) *Ecology of Soil-Borne Pathogens*. Berkeley: University of California Press, pp. 363–369.
- James and Becker, J. O. (2007) 'Identifying Microorganisms Involved in Specific Pathogen Suppression in Soil', *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), pp. 153–172. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094354.
- Jan, A. *et al.* (2016) 'Concepts for further sustainable production of foods', *Journal of Food engineering*. Elsevier Ltd, 168(2016), pp. 42–51. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.07.010.
- Jarvis, W. R. (1992) *Managing Diseases in Greenhouse Crops*. Edited by The American Phytopathological Society. St. Paul.
- Jijakli, M. H. (2003) 'Chapitre 14 : La lutte biologique en phytopathologie', in Lepoivre, P. (ed.) *Phytopathologie*. 1re éditio. De Boeck Université, pp. 289–317.
- Koechli, C. *et al.* (2019) 'Assessing fungal contributions to cellulose degradation in soil by using high-throughput stable isotope probing', *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier, 130(December 2018), pp. 150–158. doi: 10.1016/j.soilbio.2018.12.013.
- Kong, Q. *et al.* (2017) 'The performance and evolution of bacterial community of activated sludge exposed to trimethoprim in a sequencing batch reactor', *Bioresource Technology*, 244, pp. 872–879. doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.018.
- König, B. *et al.* (2018) 'Analysis of aquaponics as an emerging technological innovation system', *Journal of Cleaner Production*, 180(2018), pp. 232–243. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.037.
- Koohakan, P. *et al.* (2004) 'Evaluation of the indigenous microorganisms in soilless culture: Occurrence and quantitative characteristics in the different growing systems', *Scientia Horticulturae*, 101(2004), pp. 179–188. doi: 10.1016/j.scienta.2003.09.012.
- Kozich, J. J. *et al.* (2013) 'Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), pp. 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13.
- Krakat, N. *et al.* (2017) 'Methodological flaws introduce strong bias into molecular analysis of microbial populations', *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), pp. 364–377. doi: 10.1111/jam.13365.



- Kundim, B. A. *et al.* (2003) 'New haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium', *Journal of Antibiotics*, 56(7), pp. 630–638. doi: 10.7164/antibiotics.56.630.
- Lagier, J. C. *et al.* (2015) 'The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota', *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), pp. 237–264. doi: 10.1128/CMR.00014-14.
- Lan, Y. *et al.* (2012) 'Using the RDP classifier to predict taxonomic novelty and reduce the search space for finding novel organisms', *PLoS ONE*, 7(3), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0032491.
- Latour, X. *et al.* (2013) 'Rhodococcus erythropolis and Its  $\gamma$ -Lactone Catabolic Pathway: An Unusual Biocontrol System That Disrupts Pathogen Quorum Sensing Communication', *Agronomy*, 3(4), pp. 816–838. doi: 10.3390/agronomy3040816.
- Latz, E. *et al.* (2016) 'Unravelling Linkages between Plant Community Composition and the Pathogen-Suppressive Potential of Soils', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), pp. 1–10. doi: 10.1038/srep23584.
- Lawley, B. and Tannock, G. W. (2017) 'Analysis of 16S rRNA gene amplicon sequences using the QIIME software package', in Seymour, G., Cullinan, M., and Heng, N. (eds) *Oral Biology: Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana Press, pp. 153–163. doi: 10.1038/242542b0.
- Leach, J. E. *et al.* (2017) 'Communication in the Phytobiome', *Cell*. Elsevier Inc., 169(4), pp. 587–596. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.025.
- Lee, S. and Lee, J. (2015) 'Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems : Types and characteristics of hydroponic food production methods', *Scientia Horticulturae*. Elsevier B.V., 195, pp. 206–215. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.011.
- Lekang, O. I. (2013) 'Chapter 8: Membrane Filtration', in Lekang, O.-I. (ed.) *Aquacultural Engineering*. 2nd editio. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 99–113.
- Lepoivre, P. (2003) 'Chapitre 8 : Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire', in Lepoivre, P. (ed.) *Phytopathologie*. 1re editio. De Boeck Université, pp. 161–191.
- Li, X. *et al.* (2018) 'Suppression of soil-borne Fusarium pathogens of peanut by intercropping with the medicinal herb *Atractylodes lancea*', *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier, 116(May 2017), pp. 120–130. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.09.029.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. (1998) 'SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED', *Annual Review of Phytopathology*, 36, pp. 453–483.
- Lozupone, C. A. *et al.* (2007) 'Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), pp. 1576–1585. doi: 10.1128/AEM.01996-06.
- Lozupone, C., Hamady, M. and Knight, R. (2006) 'UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context', *BMC Bioinformatics*, 7, pp. 1–14. doi: 10.1186/1471-2105-7-371.
- Lugtenberg, B. (2015) 'Life of Microbes in the Rhizosphere', in *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, pp. 1–448. doi: 10.1007/978-3-319-08575-3.

- Marchand, G. *et al.* (2009) 'Identification of genes potentially involved in the biocontrol activity of *Pseudozyma flocculosa*', *Phytopathology*, 99(10), pp. 1142–1149. doi: 10.1094/PHYTO-99-10-1142.
- Marcon, E. (2018) *Mesures de la Biodiversité, Mesures de la biodiversité*.
- Martins, C. I. M. *et al.* (2010) 'New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability', *Aquacultural Engineering*. Elsevier B.V., 43(3), pp. 83–93. doi: 10.1016/j.aquaeng.2010.09.002.
- Maruyama, F. *et al.* (2018) 'Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria', *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier, 130(November 2018), pp. 205–219. doi: 10.1016/j.soilbio.2018.12.012.
- Mendes, R. *et al.* (2018) 'Rhizosphere interactions for disease suppression and biocontrol', pp. 4–5.
- Metzker, M. L. (2010) 'Sequencing technologies - the next generation', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 31–46. doi: 10.1038/nrg2626.
- Milinković, M. *et al.* (2019) 'Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste—Effect on plant growth and plant pathogens' suppression', *Process Safety and Environmental Protection*, 121, pp. 299–306. doi: 10.1016/j.psep.2018.09.024.
- Monsees, H., Kloas, W. and Wuertz, S. (2017) 'Decoupled systems on trial: Eliminating bottlenecks to improve aquaponic processes', *PLoS One*, 12(9), pp. 1–18.
- Mori, J. and Smith, R. (2019) 'Transmission of waterborne fish and plant pathogens in aquaponics and their control with physical disinfection and filtration: A systematized review', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 504, pp. 380–395. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.009.
- Munguia-Fragozo, P. *et al.* (2015) 'Perspective for Aquaponic Systems: "omic" Technologies for Microbial Community Analysis', *BioMed Research International*, 2015. doi: 10.1155/2015/480386.
- Nichols, M. A. and Savidov, N. A. (2012) 'Aquaponics: A nutrient and water efficient production system', *Acta Horticulturae*, 947, pp. 129–132. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.947.14.
- Nozzi, V. *et al.* (2016) 'Amyloodinium ocellatum in *Dicentrarchus labrax*: Study of infection in salt water and freshwater aquaponics', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 57, pp. 179–185. doi: 10.1016/j.fsi.2016.07.036.
- Olanya, O. M. and Lakshman, D. K. (2015) 'Potential of predatory bacteria as biocontrol agents for foodborne and plant pathogens', *Journal of Plant Pathology*, 97(3), pp. 405–417.
- Van Os, E. A. (1999) 'Closed soilless growing systems: A sustainable solution for Dutch greenhouse horticulture', *Water Science and Technology*. Elsevier, 39(5), pp. 105–112. doi: 10.1016/S0273-1223(99)00091-8.
- Pal, K. K. and McSpedden Gardener, B. (2006) 'Biological control of plant pathogens', *The Plant Health Instructor*, pp. 1–25. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.Biological.
- Patil, T. R. and Sherekar, S. S. (2013) 'Performance Analysis of ANN and Naive Bayes Classification Algorithm for Data Classification', *International Journal of Intelligent Systems and Applications in Engineering*, 6(2), pp. 256–261. doi: 10.18201/ijisae.2019252786.

- Paulitz, T. C. (1997) 'Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic systems', *HortScience*, pp. 193–196.
- Pieterse, C. M. J. *et al.* (2014) 'Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes', *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), pp. 347–375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Porras-Alfaro, A. *et al.* (2014) 'From genus to phylum: Large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), pp. 829–840. doi: 10.1128/AEM.02894-13.
- Postma, J., Bonants, P. and Van Os, E. (2001) 'Population dynamics of *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown in closed systems', *Med. Fac. Landbouww. Gent*, 66(2a), pp. 47–59.
- Postma, J., Van Os, E. and Bonants, J. M. (2008) *Interaction Between Growing Systems*. Third Edit, *Pathogen detection and management strategies in soilless plant growing systems*. Third Edit. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-52975-6.50012-5.
- Powers, D. M. W. (2011) 'Evaluation: From precision, recall and F-measure to roc, informedness, markedness & correlation', *Journal of Machine Learning Technologies*, 2(1), pp. 37–63.
- Price, M. N., Dehal, P. S. and Arkin, A. P. (2009) 'FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix', *Molecular Biology Evolution*, 26(7), pp. 1641–1650. doi: 10.1093/molbev/msp077.
- Quince, C. *et al.* (2017) 'Shotgun metagenomics, from sampling to analysis', *Nature biotechnology*, 35(12), p. 1211. doi: 10.1038/nbt1217-1211b.
- Raaijmakers, J. M. *et al.* (2010) 'Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics', *FEMS Microbiology reviews*, 34, pp. 1037–1062. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.
- Rakocy, J. E., Masser, M. P. and Losordo, T. M. (2006) 'Recirculating Aquaculture tank production system aquaponics Integrating Fish and plant', *Southern Regional Aquaculture*, 454(454). doi: 454.
- Ricotta, C. and Podani, J. (2017) 'On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning', *Ecological Complexity*. Elsevier B.V., 31, pp. 201–205. doi: 10.1016/j.ecocom.2017.07.003.
- Roh, H. J., Kim, A., *et al.* (2018) 'Blue light-emitting diode light at 405 and 465 nm can inhibit a *Miamiensis avidus* infection in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 493, pp. 176–185. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.04.045.
- Roh, H. J., Kang, G. S., *et al.* (2018) 'Blue light-emitting diode photoinactivation inhibits edwardsiellosis in fancy carp (*Cyprinus carpio*)', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 483, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.09.046.
- Ru, D. *et al.* (2017) 'Improvement of aquaponic performance through micro- and macro-nutrient addition', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research. doi: 10.1007/s11356-017-9273-1.
- Runia, W. T. (1988) 'Disinfection of drainwater from soilless cultures by heat treatment', *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 36, pp. 231–238.

- Runia, W. T. and Amsing, J. J. (2001) 'Disinfection of recirculation water from closed cultivation systems by heat treatment', *Acta Horticulturae*, 548, pp. 215–222.
- Sache, Y. (2003) 'Chapitre 9 : L'épidémiologie', in Lepoivre, P. (ed.) *Phytopathologie*. 1re édition. De Boeck Université, pp. 193–213.
- Sartori, M., Nesci, A. and Etcheverry, M. (2012) 'Production of fusarium verticillioides biocontrol agents, bacillus amyloliquefaciens and microbacterium oleovorans, using different growth media: Evaluation of biomass and viability after freeze-drying', *Food Additives and Contaminants - Part A*, 29(2), pp. 287–292. doi: 10.1080/19440049.2011.563369.
- Schmautz, Z. *et al.* (2017) 'Microbial diversity in different compartments of an aquaponics system', *Archives of Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, 199(4), pp. 613–620. doi: 10.1007/s00203-016-1334-1.
- Schnitzler, W. H. (2004) 'Pest and disease management of soilless culture', *Acta Horticulturae*, 648, pp. 191–203. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.648.23.
- Schoch, C. L. *et al.* (2012) 'Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), pp. 6241–6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109.
- Schuerger, A. C. and Hammer, W. (2009) 'Use of Cross-Flow Membrane Filtration in a Recirculating Hydroponic System to Suppress Root Disease in Pepper Caused by Pythium myriotylum', *Phytopathology*, 99(5), pp. 597–607. doi: 10.1094/phyto-99-5-0597.
- Sheikh, B. A. (2006) 'HYDROPONICS : KEY TO SUSTAIN AGRICULTURE IN WATER STRESSED AND URBAN ENVIRONMENT', 22(2), pp. 53–57.
- Sholtes, K. A. *et al.* (2016) 'Comparison of ultraviolet light-emitting diodes and low-pressure mercury-arc lamps for disinfection of water', *Environmental Technology*, 37(17), pp. 2183–2188. doi: 10.1080/09593330.2016.1144798.
- Singh, U. B. *et al.* (2013) 'Nematophagous fungi: Catenaria anguillulae and Dactylaria brochopaga from seed galls as potential biocontrol agents of Anguina tritici and Meloidogyne graminicola in wheat (Triticum aestivum L.)', *Biological Control*. Elsevier Inc., 67(3), pp. 475–482. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.10.002.
- Sirakov, I. *et al.* (2016) 'Potential for combined biocontrol activity against fungal fish and plant pathogens by bacterial isolates from a model aquaponic system', *Water (Switzerland)*, 8(11), pp. 1–7. doi: 10.3390/w8110518.
- Somerville, C. *et al.* (2014) *Small-scale aquaponic food production. Integrated fish and plant farming., FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4021e.pdf>.
- Stanghellini, M. E. *et al.* (1996) 'Efficacy of Nonionic Surfactants in the Control of Zoospore Spread of Pythium aphanidermatum in a Recirculating Hydroponic System', *Plant Disease*, pp. 422–428. doi: 10.1094/pd-80-0422.
- Stanghellini, M. E. and Rasmussen, S. L. (1994) 'Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens', *Plant disease*, 78(12), pp. 1129–1138.
- Stanghellini, M. E. and Rasumussen, S. L. (1994) 'Hydroponics: A Solution for Zoosporic Pathogens', *Plant Disease*, 78(12), pp. 1129–1138. doi: 10.1094/pd-78-1129.
- Stanghellini, M. E. and Tomlinson, J. A. (1987) 'Inhibitory and Lytic Effects of a Nonionic

Surfactant on Various Asexual Stages in the Life Cycle of *Pythium* and *Phytophthora* Species', *Phytopathology*, 77, pp. 112–114. doi: 10.1094/phyto-77-112.

Stern, V. M. *et al.* (1959) 'The integrated control concept', *Hilgardia*, 59, pp. 81–101.

Stevens, D. A. *et al.* (2000) 'Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*', *Clinical Infectious Diseases*, 30(4), pp. 696–709. doi: 10.1086/313756.

Stouvenakers, G. *et al.* (2019) 'Plant Pathogens and Control Strategies in Aquaponics', in Goddek, S. *et al.* (eds) *Aquaponics Food Production Systems*. Springer Open, pp. 353–378.

Sugita, H., Nakamura, H. and Shimada, T. (2005) 'Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish', *Aquaculture*, 243(1–4), pp. 403–409. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.09.028.

Tessmann, D. J., Charudattan, R. and Preston, J. F. (2008) 'Variability in aggressiveness, cultural characteristics, cercosporin production and fatty acid profile of *Cercospora piaropi*, a biocontrol agent of water hyacinth', *Plant Pathology*, 57(5), pp. 957–966. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01867.x.

Thomashow, L. and Bakker, A. H. M. (2015) 'Microbial control of root-pathogenic fungi and Oomycetes', in Lugtenberg, B. (ed.) *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, pp. 165–173. doi: 10.1007/978-3-319-08575-3.

Toju, H. *et al.* (2012) 'High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples', *PLoS ONE*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0040863.

Tortora, L., Diaz-Ricci and Juan C (2011) 'Azospirillum brasilense siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*', *Archives of Microbiology*, 193, pp. 275–286. doi: 10.1007/s00203-010-0672-7.

Trejo-Téllez, L. I. and Gómez-Merino, F. C. (2012) 'Nutrient Solutions for Hydroponic Systems', in Asao, T. (ed.) *Hydroponics - A standard Methodology for Plant Biological Researches*. Rijeka: InTech, pp. 1–22.

Tu, J. C., Zhang, W. Z. (2000) 'Comparison of heat, sonication and ultraviolet irradiation in eliminating *Pythium aphanidermatum* zoospores in recirculating nutrient solution', *Acta Horticulturae*, 532, pp. 137–142.

USDA (2018) *Aquaponics Good Agricultural Practices Pilot*. Available at: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2018AquaponicsGuidance.pdf>.

Vallance, J. *et al.* (2010) 'Pathogenic and beneficial microorganisms in soilless cultures', *Agronomy for Sustainable Development*, pp. 1–13. doi: 10.1007/978-94-007-0394-0.

Vanachter, A., Van Wambeke, E. and Van Assche, C. (1988) 'In vitro evaluation of the antagonistic properties of *Trichoderma* spp. against *Pyrenochaeta lycopersici* and *Phomopsis sclerotoides*', *EPPO Bulletin*, 18(1), pp. 1–7. doi: 10.1111/j.1365-2338.1988.tb00340.x.

Wang, H. *et al.* (2019) 'Different carbonic supplements induced changes of microflora in two types of compost teas and biocontrol efficiency against *Pythium aphanidermatum*', *Biocontrol Science and Technology*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–16. doi: 10.1080/09583157.2019.1625027.

Wang, Q. *et al.* (2007) 'Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), pp. 5261–

5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07.

Wang, Yucheng *et al.* (2017) 'Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art', *Drug Resistance Updates*. Elsevier, 33–35(April), pp. 1–22. doi: 10.1016/j.drug.2017.10.002.

Weller, D. M. *et al.* (2002) 'Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens', *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), pp. 309–348. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010.

Whipps, J. M. (2001) 'Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.', *Journal of experimental botany*, 52(Spec Issue), pp. 487–511. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326055>.

Wongkiew, S. *et al.* (2017) 'Aquacultural Engineering Nitrogen transformations in aquaponic systems: A review', *Aquacultural Engineering*. Elsevier B.V., 76(2017), pp. 9–19. doi: 10.1016/j.aquaeng.2017.01.004.

Wu, Q. Y. *et al.* (2019) 'Underestimated risk from ozonation of wastewater containing bromide: Both organic byproducts and bromate contributed to the toxicity increase', *Water Research*, 162, pp. 43–52. doi: 10.1016/j.watres.2019.06.054.

Xia, Y. *et al.* (2008) 'Identification and ecophysiological characterization of epiphytic protein-hydrolyzing Saprospiraceae ("Candidatus epiflobacter" spp.) in activated sludge', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), pp. 2229–2238. doi: 10.1128/AEM.02502-07.

Xiao, X. *et al.* (2017) 'Interactions of plant growth-promoting rhizobacteria and soil factors in two leguminous plants', *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 101(23–24), pp. 8485–8497. doi: 10.1007/s00253-017-8550-8.

Xu, L. *et al.* (2012) 'Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing', *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd, 46, pp. 26–32. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.11.010.

Xu, L. *et al.* (2018) 'Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage', *Journal of Environmental Sciences (China)*. Elsevier B.V., 65, pp. 356–366. doi: 10.1016/j.jes.2017.07.006.

Yang, B., Wang, Y. and Qian, P. Y. (2016) 'Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis', *BMC Bioinformatics*. BMC Bioinformatics, 17(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.

Yang, L. *et al.* (2008) 'Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1 - Potential antibiotics against plant pathogenic fungi', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), pp. 909–915. doi: 10.1007/s11274-007-9626-x.

Yang, M. *et al.* (2013) 'Biological Control of Wheat Root Diseases by the CLP-Producing Strain *Pseudomonas fluorescens* HC1-07', *Phytopathology*, 104, pp. 248–256.

Zillich, J. A. (1972) 'Toxicity of combined chlorine residuals to freshwater fish.', *Journal - Water Pollution Control Federation*, 44(2), pp. 212–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5062564>.