



REPUBLIQUE TUNISIENNE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE TUNIS EL MANAR
Faculté des Sciences de Tunis El Manar
Département des Sciences Biologiques

THÈSE
DE
DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Lutte biologique contre les moisissures
toxigènes**

Présentée Par

Mayssa ARFAOUI

Soutenue le 10 Juin 2019 devant le jury composé de

Président :	Pr Aly RAIES (FST)
Rapporteur :	Pr Najoua KARRAY-BOURAOUI (FST)
Rapporteur :	Pr Mohammed Rabah HAJLAOUI (INRAT)
Examineur	Pr Moncef MRABET (CBBC)
Directeur de thèse :	Pr Najla SADFI-ZOUAOUI (FST)
Co-Directeur de thèse :	Pr Patrice REY (Bordeaux Sciences Agro)



THÈSE

en vue de l'obtention de

DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Délivrée par la Faculté des Sciences de Tunis El Manar

Lutte biologique contre les moisissures toxino-gènes

Présentée Par

Mayssa ARFAOUI

Soutenue le 10 Juin 2019 devant le jury composé de

Président :

Pr Aly RAIES (FST)

Rapporteur :

Pr Najoua KARRAY-BOURAOUI (FST)

Rapporteur :

Pr Mohammed Rabah HAJLAOUI (INRAT)

Examineur

Pr Moncef MRABET (CBBC)

Directeur de thèse :

Pr Najla SADFI-ZOUAOUI (FST)

Co-Directeur de thèse :

Pr Patrice REY (Bordeaux Sciences Agro)

Invité :

Dr Samir CHEBIL (CBBC)

Dédicace

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE MOUNIRA, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et Bonheur

A MON TRÈS CHÈRE PÈRE BADER, De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourras-tu trouver dans ce travail le fruit de toutes tes peines et de tous tes efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu te préserver et te procurer santé et bonheur.

A Mon TRÈS CHÈRE MARI MOUNIR, Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour et mon attachement à toi. Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours la meilleure. Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Je te remercie pour ta patiente et tes encouragements. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect. Je remercie le bon Dieu de t'avoir mis sur mon chemin.

A MON PETIT BOU DE CHOU, MON FILS, AYRON, qui a donné un sens à ma vie et qui l'illumine de tout son éclat. Tu es la plus belle réussite de ma vie. Je sais que t'a supporté ma mauvaise humeur parfois à cause des difficultés que j'ai rencontrées durant la rédaction de l'article et de la thèse, maintenant tout est fini et on va pouvoir profiter vraiment. Puisse dieu te protéger, te procurer santé et longue vie.

A MA FRÈRES GHAZI, SOUHAIB, JIHED ET MA SŒUR SYRINE, mes chers, comme vous, on ne peut trouver nulle part ailleurs, vous étiez toujours là à mes côtés pour m'encourager. Puisse Dieu vous protégez, gardez et renforcez notre fraternité. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

A MA GRANDE MÈRE SALAMOUNA, MON GRAND PÈRE SALAH, Ma TANTE NAZIHA ET MES ANCIÈS FADHEL ET HMIDA, Je vous dédie ce travail en réponse à l'affection que vous avez toujours eu à mon égard, merci pour vos encouragements, merci Douda pour tes prières et ton douaa.

A TOUTE MA FAMILLE...

A MES CHÈRES AMIS...

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer ma gratitude et mes profonds remerciements à mes directeurs de thèse Pr Najla Sadfi-Zouaoui et Pr Patrice Rey qui m'ont encadrée et soutenue tout au long de cette thèse. Mme Najla, je suis très reconnaissante envers vous d'avoir accepté de m'encadrer et pour la chance que vous m'avez donnée quand j'ai eu des difficultés à Borj Cedria, merci pour vos conseils, pour l'aide continue que vous m'avez apportée et pour votre encouragement à mener à terme ma thèse. Mr Patrice, je suis très reconnaissante pour votre confiance et pour la chance que vous m'avez accordée depuis que vous m'avez acceptée en tant que stagiaire au sein de votre équipe. Merci de m'avoir accueillie pendant trois ans au sein de votre laboratoire, c'est grâce à vous que j'ai pu concilier avec bonheur recherche théorique et appliquée pendant cette thèse. Merci mes professeurs pour votre patience et pour vos conseils directives qui m'ont aidée à améliorer mon travail. Merci pour vos qualités humaines.

Je suis également reconnaissante envers Jessica Vallance qui m'a encadrée tout au long de ma thèse, je te remercie beaucoup pour ton effort pour me diriger et m'aider à finaliser mes travaux, pour toute ta gentillesse, ton aide, tes conseils, ta bonne humeur de tous les jours et pour m'avoir soutenue sur le plan professionnel et personnel. Grâce à toi j'ai pu tenir jusqu'au bout.

J'adresse mes remerciements à Mr Samir Chebil. Grâce à vous, j'ai commencé ma belle aventure de doctorat, merci pour votre soutien et votre aide, merci de m'avoir dirigée afin de démarrer mes travaux. Malgré que vous ayez trouvé votre chemin de réussite, vous étiez toujours là pour m'encourager.

Je tiens à remercier vivement Pr Aly Raies d'avoir accepté de Présider mon jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de profond respect.

Je tiens à remercier Mme Najoua KARRAY, Professeur de Physiologie Végétale à La Faculté des Sciences de Tunis et Mr Moncef MRABET Maître de Conférences au CBBC pour le temps qu'ils ont consacré pour lire mon manuscrit. Leurs critiques et appréciations ne pourront qu'enrichir mon travail.

Je voulais remercier spécialement mon maître Mr Mohamed Rabeh Hajlaoui de m'avoir prodiguée de nombreux conseils pour bien débiter le troisième cycle universitaire dont cette thèse est l'accomplissement.

Je remercie également les financeurs de ce projet : le ministère Français de l'Agriculture (projet CASDAR V1302) et le ministère Tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (bourse d'alternance).

Je tiens à remercier Denis Thiery, qui a été le directeur de l'UMR SAVE, Santé et Agroécologie du Vignoble à l'INRA Bordeaux, pour son accueil au sein du laboratoire où a été réalisée la grande partie de ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'UMR SAVE qui ont contribué à la réalisation de ce travail. La très bonne humeur et l'ambiance au sein du groupe m'ont permis de mener mes travaux de recherche de façon très agréable. Un grand merci à Dominique Blancard et Jonathan Gaudin pour votre aide pour l'observation microscopique. Merci à Olivier Bonnard pour son aide et sa disponibilité pour les analyses biochimiques. Je voudrais remercier le Dr Marc Fermaud et Mr Gilles Taris pour leur aide à réaliser mes expérimentations (comptage des bactéries à l'épifluorescence, Plaques Biolog et les essais *in vivo* sur raisins). Merci à Lionel Delbac, Marie-Christine Medalin, Sonia Perrot et Sylvie Richart-Cervera pour leurs attentions et leur aide à chaque fois que j'ai eu besoin. Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées à l'unité SAVE. Merci pour votre accueil chaleureux, votre support et vos encouragements.

Merci à tous mes amis thésards et mes collègues de bureaux, qui ont partagé avec moi cette belle aventure et qui sont devenues des docteurs maintenant : Amira, Awatef, Carolina, Lucile et Rana.

Un grand merci à mes amis au dehors du labo : Hayfa et Mohammed Tayeb. Merci pour tous les beaux moments passés ensemble depuis le mastère. Nous avons passé ensemble les beaux et mauvais moments même à distance, merci pour vos encouragements. Merci Hayfa pour tes conseils et ta présence.

Résumé : Les champignons phytopathogènes attaquant les fruits en récolte et en post-récolte constituent une menace majeure pour le secteur alimentaire mondial. En particulier, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* qui, outre leur capacité à causer la pourriture, menacent la santé publique humaine et animale à cause de leurs productions de toxines, en particulier l'ochratoxine A (OTA). Cette mycotoxine a un impact économique important et pose un grave problème de santé humaine, elle attire de plus en plus l'attention dans le monde entier afin d'en réduire les risques d'exposition pour les consommateurs. L'objectif de cette thèse porte principalement sur l'élaboration de méthodes de contrôle visant à limiter les espèces ochratoxigéniques qui peuvent coloniser les parties endommagées des plantes et ainsi contaminer la chaîne alimentaire.

Dans un premier temps, un isolement de souches d'*Aspergillus* à partir de baies de raisin de deux vignobles parmi les plus producteurs en Tunisie (Mornag et Zaghouan) a été effectué. Sur le même thème, un isolement à partir de pommes pourries a permis d'obtenir différentes espèces fongiques dont la plupart étaient des souches de *Penicillium*. Ces champignons ont été identifiés au niveau morphologique et moléculaire. Une quantification de l'OTA a permis de sélectionner les souches les plus productrices, *i.e.* deux souches d'*Aspergillus* ASP31 (*A. carbonarius*) et ASP73 (*A. ochraceus*) et une souche de *Penicillium verrucosum*.

Dans une deuxième étape, la microflore bactérienne colonisant les rhizosphères des vignobles Tunisiens a été étudiée afin de sélectionner des souches ayant un caractère antagoniste. Un total de 39 souches bactériennes a été isolé et identifié à l'aide du séquençage des gènes d'ADNr 16S et *rpoB*: 35 étaient des *Bacillus sp.*, 2 souches étaient des *Brevibacterium sp.*, 1 était *Paenibacillus sp.* et 1 souche était *Microbacterium oxydans*. Les criblages biochimiques et microbiologiques ont révélé que ces 39 souches (i) métabolisaient différemment les sources de carbone, (ii) possédaient des gènes d'antibiotiques et (iii) produisaient des sidérophores et solubilisait les phosphates. Sur la base de leurs caractéristiques PGP (Plant Growth Promoting), 21 souches ont été sélectionnées pour tester leurs activités antifongiques vis-à-vis des trois agents pathogènes sécréteurs d'OTA.

Par la suite, afin de trouver des agents de lutte potentiels, les 21 souches bactériennes retenues ont été testées *in vitro* pour leur effet antagoniste contre les trois agents pathogènes fongiques, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. verrucosum*. Toutes les souches bactériennes ont été en mesure de réduire la croissance mycélienne fongique des trois champignons ochratoxinogènes. En effet, *Bacillus amyloliquefaciens* (I2) était le plus efficace contre *A. ochraceus*. Dans le cas d'*A. carbonarius* le meilleur résultat a été obtenu avec *Bacillus pumilus* (G3AX). Cette même souche était également la plus efficace contre *P. verrucosum*. Lors du test *in vitro* avec des baies détachées, les résultats ont montré la capacité de la souche G3AX de *B. pumilus* à inhiber les contaminations par *Aspergillus spp.* à la surface de la baie allant jusqu'à 77% pour *A. carbonarius* et 50% pour *A. ochraceus*. L'efficacité des souches bactériennes dépendait fortement de la présence ou de l'absence de blessures. Une réduction significative de 87% de la pourriture causée par *Penicillium* sur les pommes avec cette même souche de *Bacillus pumilus* a été notée. Le niveau de protection par les souches antagonistes dépendait significativement de la souche bactérienne, de l'espèce de champignon pathogène ciblée et de l'organe végétal hôte.

Mots clés : Activité antifongique, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus pumilus*, Biocontrôle, ochratoxine A, *Penicillium verrucosum*.

Abstract: Phytopathogenic fungi attacking both harvesting and post-harvesting fruit constitute a major threat to the global food sector, in particular *Aspergillus* and *Penicillium* species. Species belonging to these two genera have the ability to cause rot, but especially threaten human and animal health because of their production of toxins, especially the ochratoxin A (OTA). This mycotoxin has a significant economic impact and poses a serious human health problem. It is gaining increasing attention around the world in order to reduce the risk of exposure for consumers. The aim of this thesis was mainly to develop control methods to limit ochratoxigenic species that can colonize the damaged parts of plants and thus contaminate the food chain.

At first, an isolation of *Aspergillus* strains from grapes in two vineyards among the most producing in Tunisia (Mornag and Zaghouan) was carried out. Similarly, isolation from rotten apples led to the recovering of different fungal species, most of them were *Penicillium* strains. These fungi were morphologically and molecularly identified. Quantitation of OTA allowed the selection of the most productive strains: two *Aspergilli*, i.e. *A. carbonarius* ASP31 and *A. ochraceus* ASP73, and one strain of *Penicillium verrucosum*.

In a second step, the bacterial microflora colonizing the rhizosphere of Tunisian vineyards was sampled and studied in order to select strains with antagonistic abilities. A total of 39 bacterial strains were recovered and identified using 16S rDNA and *rpob* gene sequencing: 35 were *Bacillus* sp., 2 strains were *Brevibacterium* sp., 1 was *Paenibacillus* sp. and 1 strain was *Microbacterium oxydans*. Biochemical and microbiological screenings revealed that those 39 strains (i) metabolized differently carbon sources, (ii) possessed antibiotic genes, and (iii) produced siderophores and solubilized phosphates. Based on their PGP (Plant Growth Promoting) traits, 21 strains were selected to test their antifungal activities against three OTA producing pathogens.

Subsequently, biological control assays were carried out and the 21 selected bacterial strains were tested *in vitro* for their antagonistic effect against the three fungal pathogens, i.e. *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and *P. verrucosum*, in order to find potential control agents. All bacterial strains were able to reduce the mycelial growth of the three ochratoxinogenic fungi. *Bacillus amyloliquefaciens* (I2) was the most effective against *A. ochraceus*. In the case of *A. carbonarius*, the best result was obtained with *Bacillus pumilus* (G3AX). This same strain was also the most effective against *P. verrucosum*. In the *in vitro* test with detached berries, the results showed the ability of *B. pumilus* strain G3AX to inhibit *Aspergillus* spp. at the berry surface up to 77% for *A. carbonarius* and 50% for *A. ochraceus*. The effectiveness of the bacterial strains was highly dependent on the presence or absence of wounds. A significant reduction of 87% of *Penicillium* rot on apples with this same strain of *Bacillus pumilus* was observed. The level of protection exerted by the antagonistic bacteria depended significantly on the strain, the target pathogenic fungus and the host plant organ.

Key words: Antifungal activity, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Bacillus* spp., *Bacillus pumilus*, Biocontrol, ochratoxine A, *Penicillium verrucosum*.

Liste des abréviations

A : *Aspergillus*

ACP : Analyse en Composantes Principales

AFB1 : Aflatoxine B1

ANOVA : Analysis of variance

AWCD : Average Well Color Development

CAS : Milieu gélosé chromazurol S

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

COV : Composés organiques volatils

CTAB : Céthyl triméthyl-ammonium bromide

CYA : Czapec-Yeast Agar

dNTP : désoxy-adénine tri-phosphate

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylène diamine tétracétique

e.g : *exempli gratia* – Par exemple

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

MEA : Malt Extract Agar

OTA : Ochratoxine A

P : *Penicillium*

PAT : Patuline

PDA : Potato Dextrose Agar

PGP : Plant Growth Promoting

PVK : Gélose de Pikovskaya

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

FDA : Food and Drug Administration des États-Unis

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

FAO : Organisation pour l'agriculture de l'alimentation

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

Introduction générale.....	1
Analyses bibliographiques.....	4
1. Mycotoxines	6
1.1. Définition et généralités	6
1.2. Voie de biosynthèse des mycotoxines.....	6
1.3. Occurrence et toxicité des mycotoxines.....	8
1.4. Règlementation et législation.....	10
2. Ochratoxine A	11
2.1. Historique.....	11
2.2. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA	12
2.3. Techniques d'analyse	13
2.3.1. Protocole de dosage de l'OTA par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	13
2.3.2. Dosage de l'OTA par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	13
2.3.3. Dosage de l'OTA par Chromatographie Liquide Haute performance (CLHP).....	14
2.4. Profil Toxicologique	14
2.4.1. Cancérogenèse	14
2.4.2. Génotoxicité	15
2.4.3. Néphrotoxicité.....	16
2.4.4. Neurotoxicité.....	16
2.4.5. Immunotoxicité	17
2.4.6. Tératogénicité.....	17
3. Voies de synthèse de l'OTA.....	17
4. Principaux champignons producteurs d'ochratoxine A	19

4.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	20
4.1.1. Systématique	20
4.1.2. <i>Aspergillus ochraceus</i> (<i>alutaceus</i> var. <i>alutaceus</i>)	21
4.1.3. <i>Aspergillus carbonarius</i>	23
4.2. Le genre <i>Penicillium</i>	24
4.2.1. Systématique	24
4.2.2. Habitat et niche écologique.....	25
4.2.3. <i>Penicillium verrucosum</i>	25
5. Principales plantes/fruits attaques par <i>Pspergillus</i> et <i>Penicillium</i>.....	27
5.1. Les baies de raisins.....	27
5.1.1. Ochratoxine A et filière raisin.....	28
5.2. Les pommes.....	29
6. Les methodes de lutte contre les pourritures des fruits.....	30
6.1.1. Lutte chimique contre la pourriture à <i>Aspergillus</i> des raisins.....	30
6.1.2. Lutte chimique contre la moisissure bleue des pommes causée par <i>Penicillium</i> ...	32
6.2. Lutte biologique.....	33
6.2.1. Agents de lutte biologique	33
6.2.1.1. Les substances naturelles	33
6.2.1.2. Champignons et oomycètes.....	33
6.2.1.3. Les bactéries	34
6.3. Mécanismes d'action des bactéries impliquées dans la lutte biologique contre les champignons	35
6.3.1. La compétition pour l'espace et les nutriments	35
6.3.2. L'antibiose	36
6.3.3. Production d'enzymes lytiques et interférence avec l'activité et la croissance des agents pathogènes	36
6.3.4. Production de composés organiques volatils	37
6.3.5. Induction de la résistance de la plante hôte.....	37
Mathériels et méthodes.....	39
1. Les microorganismes pathogènes	40
1.1. Matériel vegetal et echantillonnage	40
1.2. Isolement et identification morphologique des isolats du genre <i>Aspergillus</i>.....	40
1.3. Isolement et caractérisation des isolats du genre <i>Penicillium</i>	41
1.4.1. Extraction de l'ADN génomique.....	42

1.4.2.	Amplification par PCR et séquençage des gènes ITS.....	42
1.5.	Etude du pouvoir toxigène chez <i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp.....	43
1.5.1.	Criblage des isolats producteurs d'OTA.....	43
1.5.2.	Extraction de l'OTA	43
1.5.3.	Identification du pouvoir toxigène de chaque souche fongique pure par HPLC.....	44
2.	Les bacteries antagonistes	46
2.1.	Matériel végétal et échantillonnage	46
2.2.	Isolement des bactéries de la rhizosphère du vignoble tunisien.....	46
2.3.	Identification moléculaire des bactéries par séquençage des gènes ARNr 16S et <i>rpoB</i>	47
2.3.1.	Extraction d'ADN des souches pures	47
2.3.2.	Amplification et séquençage.....	47
2.4.	Dépistage des caractères antagonistes favorisant la croissance des plantes (PGP)	48
2.4.1.	Détection des gènes codant pour deux familles d'antibiotiques.....	48
2.4.2.	Production de sidérophores.....	49
2.4.3.	Solubilisation du phosphate	50
2.5.	Caractérisation métabolique des rhizobactéries par des plaques Biolog EcoPlate™.....	50
2.5.1.	Comptage des populations bactériennes par épifluorescence.....	50
2.5.2.	Identification des sources nutritives métabolisables : Biolog EcoPlate™	51
3.	Antagonisme <i>in vitro</i> contre les champignons ochratoxigeniques, <i>Aspergillus</i> spp. et <i>P. verrucosum</i>	52
3.1.	Confrontations directes.....	52
3.2.	Substances bactériennes volatiles	53
3.3.	Essais biologiques <i>in vitro</i> sur baies de raisin avec <i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>A. carbonarius</i>	53
3.4.	Etude de l'activité antagoniste des bactéries sur les pommes	55
	Résultats et discussions.....	56
	Chapitre I. Caractéristiques des pathogènes fongiques ochratoxinogènes.....	57
1.	Introduction.....	58
2.	Resultats.....	58

2.1. Sélection des <i>Aspergillus</i> responsables de la pourriture de raisins	58
2.1.1. Isolement et identification macroscopique et microscopique	58
2.1.2. Identification moléculaire	63
2.1.3. Sélection des <i>Aspergillus</i> ochratoxinogènes isolés à partir de raisins : quantification de l'OTA par HPLC	63
2.2. Sélection des agents pathogènes responsables de la pourriture bleue des pommes 64	
2.2.1. Isolement et identification macroscopique et microscopique des <i>Penicillium</i> à partir des pommes pourris	64
2.2.2. Identification moléculaire	66
2.2.3. Sélection des <i>Penicillium</i> ochratoxinogènes par quantification de l'OTA par HPLC 67	
3. Discussion	67
4. Conclusion	71

Chapitre II. Etude de la communauté bactérienne colonisant les sols des vignobles tunisiens et sélection des antagonistes.....**72**

1. Introduction	73
2. Resultats	73
2.1. Caractérisation des souches bactériennes isolées de la rhizosphère des vignobles tunisiens	73
2.1.1. Isolement des bactéries rhizosphériques des vignobles tunisiens.....	73
2.1.2. Identification moléculaire par séquençage des gènes ADNr 16S et <i>rpoB</i>	73
2.2.3. Détection des gènes codants pour deux familles d'antibiotiques	74
2.2.4. Dépistage des caractères antagonistes favorisant la croissance des plantes (PGP)	74
2.2. Profils physiologiques (CLPP) des rhizobactéries	78
3. Discussion	79
4. Conclusion	81

Chapitre III. Essai de lutte biologique contre *A. carbonarius* et *A. ochraceus* sur les baies de raisins et contre *P. verrucosum* sur les pommes.....**83**

1. Introduction	84
2. Resultats	84

2.1. Essais de lutte biologique <i>in vitro</i> contre <i>Aspergillus</i> sur baies de raisin	84
2.1.1. Antagonisme bactérien <i>in vitro</i> contre deux champignons ochratoxigéniques	84
2.1.1.1. Confrontation directe.....	85
2.1.1.2. Substances bactériennes volatiles.....	87
2.1.2. Essais <i>in vivo</i> sur des baies de raisin.....	88
2.1.2.1. Inhibition des altérations sur baies dues à <i>A. carbonarius</i> par l'action de souches bactériennes antagonistes	89
2.2. Essais de lutte biologique contre <i>P. verrucosum</i> <i>in vitro</i> et sur des pommes.....	93
2.2.1. Antagonisme bactérien <i>in vitro</i> contre une souche de <i>P. verrucosum</i> ochratoxinogène.....	93
L'inhibition de la croissance mycélienne de <i>P. verrucosum</i> a été mise en évidence par deux tests d'antagonismes <i>in vitro</i> (Fig. 36), afin de trouver des souches bactériennes antagonistes capables d'éliminer et /ou de réduire les maladies bleues des pommes causées par les <i>Penicillium</i> . Dans nos essais, 21 souches bactériennes ont été testées pour leurs effets inhibiteurs contre <i>P. verrucosum</i> , un champignon ochratoxinogène.	93
2.2.1.1. Confrontation directe.....	93
2.2.1.2. Substances bactériennes volatiles.....	94
2.3. Essai de lutte contre <i>P. verrucosum</i> sur pommes.....	95
3. Discussion.....	97
4. Conclusion.....	100
Conclusion générale et perspectives.....	101
Références bibliographiques.....	106
Valorisation des résultats.....	116

Liste des Tableaux

Tableau 1. Les principales mycotoxines ainsi que leurs effets possibles sur la santé de l'homme et leur occurrence dans les aliments et les denrées alimentaires (CAST, 2003; AFSSA, 2009).....	9
Tableau 2. Niveaux de mycotoxines autorisés par l'Union Européenne (UE) dans les aliments et les denrées alimentaires qu'elles contaminent (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006).....	10
Tableau 3. Amorces utilisées pour le séquençage.....	43
Tableau 4. Quantités d'OTA en ppm	45
Tableau 5. Amorces utilisées pour le séquençage.....	48
Tableau 6. Amorces spécifiques pour la recherche des gènes codant pour les fengycines A	49
Tableau 7. Origine et identification moléculaire des souches fongiques isolées à partir des raisins. (ASP31 et ASP73 sont les souches sélectionnées pour les essais in vivo et in vitro).	59
Tableau 8. Teneurs en OTA secrétées par les différentes souches d'Aspergillus.....	64
Tableau 9. Origine et identification moléculaire des Penicillium isolés sur des pommes.	66
Tableau 10. Quantités d'OTA secrétées par les trois souches de Penicillium.	67
Tableau 11. Description et caractérisation in vitro des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de sols de vignobles tunisiens.....	76

Liste des Figures

Figure 1. Les différentes voies métaboliques des mycotoxines. NRPS : peptide synthétase non ribosomiques; PKS : polycétide synthase ; TC : terpènes cyclase ; DMAST : diméthylallyl transférase (El Khoury, 2017).....	7
Figure 2. Structure chimique de l'OTA. Schéma adapté de El Khoury and Atoui (2010).....	12
Figure 3. Origines biosynthétiques des mycotoxines majeures. En bleu sont montrées les trois voies de biosynthèse principales et en rouge les catégories biosynthétiques qui en découlent. Schéma adapté de Tabuc (2007), Leyral and Vierling (2007) et Bu'Lock (1980).....	19
Figure 4. Cycle de reproduction sexuée et asexuée d' <i>Aspergillus</i> . (Diguta, 2011).....	21
Figure 5. Tête aspergillaire d' <i>Aspergillus ochraceus</i> (A), en microscopie électronique (B) ..	22
Figure 6. Aspect des colonies d' <i>Aspergillus ochraceus</i> sur milieu de culture synthétique MEA (INRA, 2015).....	22
Figure 7. Tête aspergillaire d' <i>A. ochraceus</i> en microscopie optique (320x). (INRA, 2016) ..	23
Figure 8. Aspect des colonies d' <i>Aspergillus carbonarius</i> sur milieu de culture synthétique MEA (INRA, 2016).....	23
Figure 9. Aspect et structure microscopiques d' <i>A. carbonarius</i> (Diguta, 2011).	24
Figure 10. <i>Penicillium</i> mono, bi, tri et quadriverticillé (Diguta, 2011).	25
Figure 11. Aspect macroscopique de <i>P. verrucosum</i> après 7 jours sur milieu MEA (INRA, 2015).....	26
Figure 12. Aspect des colonies de <i>P. verrucosum</i> après 7 jours sur milieu CYA (El khoury, 2011).....	27
Figure 13. Grappe de raisins contaminée par des moisissures du genre <i>Aspergillus</i> (Ephytia, INRA).....	28
Figure 14. Symptômes de pourriture bleue causée par <i>Penicillium expansum</i> (INRA, 2016). 30	
Figure 15. Chromatogramme des standards (A) 5, (B) 10, (D) 100, (E) 500, (F) 1000 ppm . 45	
Figure 16. Courbe étalon utilisée pour déterminer la quantité d'OTA.....	46
Figure 17. Photographie d'un champ de comptage d'épifluorescence de la souche S23 (grossissement x1250).....	51
Figure 18. Sources de carbone contenues dans une plaque Biolog EcoPlate™.....	52
Figure 19. Schéma et photographie du dispositif de mise en co-culture.....	53
Figure 20. Aspect macroscopique des souches d' <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>A. ochraceus</i> (B), <i>A. carbonarius</i> (C), et <i>A. niger</i> (D) après 7 jours d'incubation à 25°C sur milieu MEA.	61

Figure 21. Aspects microscopiques de conidophores d' <i>Aspergillus</i> observés au microscope optique (objectif x320). <i>Aspergillus flavus</i> (A), <i>A. ochraceus</i> (B), <i>A. niger</i> (C), et <i>A. carbonarius</i> (D).....	62
Figure 22. Aspects des colonies des différents champignons isolés à partir des pommes pourries. <i>Fusarium</i> (A), <i>Botrytis</i> (B), <i>Penicillium</i> (C et D).	65
Figure 23. Aspect de <i>Penicillium</i> en microscopie optique (objectif x320).	66
Figure 24. Halo formé par la souche G3AX de <i>B. pumilus</i> suite à la solubilisation du phosphate après incubation pendant 15 jours sur milieu gélosé PVK à 28°C.	75
Figure 25. Production de sidérophores (+++) : Halo orange se forme autour des colonies bactériennes suite à l'élimination de Fe ³⁺ après incubation pendant 7 jours à 25°C sur milieu CAS.	75
Figure 26. Plaque Biolog Ecoplateensemencée avec <i>Bacillus pumilus</i> (G3AX) en fin de réaction (120h)	78
Figure 27. Analyse en Composantes Principales (ACP) des souches rhizobactériennes isolées du vignoble tunisien en fonction de leurs profils cataboliques obtenus avec des plaques Biolog Ecoplates. Les points représentent la moyenne de 3 échantillons répétés. La variation (%) expliquée par chaque axe est indiquée entre parenthèses. Les plaques Biolog Ecoplates ont été incubées pendant 48h à 27°C dans l'obscurité.	79
Figure 28 Antagonisme <i>in vitro</i> : Confrontation directe contre <i>A. carbonarius</i> (A) et <i>A. ochraceus</i> (B) ; Substances volatiles (C), après incubation à 27°C à l'obscurité pendant 5 et 7 jours.....	85
Figure 29. Effet des rhizobactéries sur la croissance du champignon ochratoxigénique <i>Aspergillus carbonarius</i> . Les données sont les moyennes de 3 répétitions ± l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative.....	86
Figure 30. Effet des rhizobactéries sur la croissance du champignon ochratoxigénique <i>Aspergillus ochraceus</i> . Les données sont les moyennes de 3 répétitions ± l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P>0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis.	86
Figure 31. Effet des composés volatiles bactériens sur la croissance du champignon ochratoxigénique <i>Aspergillus carbonarius</i> . Les données sont les moyennes de 3 répétitions ± l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P>0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis.....	87

- Figure 32.** Effet des composés bactériens volatiles sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Aspergillus ochraceus*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P>0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis..... 88
- Figure 33.** Baies de raisins blessées (A) (C) et non blessées (B) (D) après inoculation avec les bactéries antagonistes et l'agent pathogène, *i.e.* *Aspergillus ochraceus* (A) (B) et *Aspergillus carbonarius* (C) (D), après incubation à 28°C dans le noir pendant 24 h..... 89
- Figure 34.** Effet des rhizobactéries sur le développement de la pourriture au champignon ochratoxigénique *Aspergillus carbonarius* sur des baies de raisin blessées (barres bleu) et non blessées (barres gris clair). Les valeurs moyennes (20 répétitions) partageant les mêmes lettres majuscules ou minuscules ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey après ANOVA à $p < 0.05$ (une ANOVA par type de baies, blessées ou non). UUC: Témoin non inoculé non traité, UC: Témoin non traité mais inoculé avec *A. carbonarius*, MC: Témoin milieu (LB stérile), FC: Témoin fongicide (Fluaziname). 90
- Figure 35.** Effet des rhizobactéries sur le développement de la pourriture du champignon ochratoxinogène *Aspergillus ochraceus* sur des baies blessées (barres gris foncé) et non blessées (barres gris clair). Les valeurs moyennes (20 répétitions) partageant les mêmes lettres majuscules ou minuscules ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey après ANOVA à $p < 0.05$ (une ANOVA par type de baies, blessées ou non). UUC: Témoin non traité non inoculé avec l'agent pathogène, UC: Témoin non traité et inoculé avec *A. ochraceus*, MC: Témoin milieu (LB stérile), FC: Témoin fongicide (Fluaziname). 92
- Figure 36.** Antagonisme *in vitro* : Confrontation directe (A) (B) et Substances volatiles (C) contre *P. verrucosum* après incubation à 27°C à l'obscurité pendant 5 et 7 jours..... 93
- Figure 37.** Effet des rhizobactéries sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Penicillium verrucosum*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives ($P>0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis. 94
- Figure 38.** Effet des composés bactériens volatils sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Penicillium verrucosum*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives ($P>0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis. 95
- Figure 39.** Essai de protection des pommes contre le champignon ochratoxinogène *P. verrucosum*. (A) UC : Témoin négatif (pomme inoculée avec le champignon seulement),

UUC : Témoin positif, non traité et non inoculé ; (B) Pommes inoculées avec *P. verrucosum* et G3AX après incubation pendant 10 jours à 26°C. 96

Figure 40. Effet des rhizobactéries sur le développement de la pourriture au champignon ochratoxinogène *Penicillium verrucosum* sur les pommes. Les valeurs moyennes (3 répétitions) partageant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey après ANOVA à $p < 0.05$. UUC: Témoin non traité et non inoculé, UC: Témoin non traité (inoculé avec *P. verrucosum*), MC: Témoin milieu (LB stérile), FC: Témoin fongicide (Fluaziname)..... 96

Introduction Générale

Introduction Générale

La prévention des risques de contamination des produits alimentaires par les mycotoxines, constitue un enjeu majeur pour l'ensemble des opérateurs des filières de l'agroalimentaire. Les cas d'intoxication ont de tout temps défrayé la chronique et peuvent avoir des conséquences économiques très graves.

Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination. Tandis que les professionnels de l'agro-industrie prennent des mesures de plus en plus strictes pour garantir l'innocuité des aliments, les pouvoirs publics mettent également en place des normes de plus en plus sévères pour prévenir au mieux les risques sanitaires.

De nos jours, parmi la multitude de contaminants connus, les mycotoxines sont des substances naturelles produites par le métabolisme secondaire des champignons. Elles exercent un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) même lorsqu'elles sont présentes en faibles quantités (Eskola, 2002; El khoury *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2017). Les conditions de contamination par les champignons responsables, leur prolifération, ainsi que les conditions de production des mycotoxines par ces micro-organismes sont peu connues.

Actuellement, il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques recensés mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes (El khoury *et al.*, 2010). La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques mais pas obligatoirement par toutes les souches appartenant à une même espèce (Eskola, 2002). Parmi les métabolites les plus toxiques, l'ochratoxine A (OTA) et l'aflatoxine B1 (AFB1) sont des contaminants majeurs de l'alimentation animale (volaille, porcs, vaches) et humaine (chaîne alimentaire) par l'intermédiaire des céréales et des farines. L'OTA est la mycotoxine la plus courante ; elle a été détectée dans les raisins et les produits dérivés, tels que les jus de raisin, les vins et les fruits de vigne séchés (Aksoy *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2008; Zimmerli et Dick, 1996). Des études sur l'OTA dans le vin ont mis en évidence la présence de cette mycotoxine dans le vignoble méditerranéen. Il a été rapporté que les conditions climatiques méditerranéennes étaient favorables à la croissance des champignons ochratoxigéniques et à la production de cette mycotoxine (Covarelli *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2010; El Khoury *et al.*, 2006; Lasram *et al.*, 2010). En plus, cette mycotoxine a été trouvée principalement dans les aliments dérivés de plantes, telles que les céréales (Juan *et al.*, 2007), le café (Taniwaki *et al.*, 2003), les noix (Overy *et al.*, 2003), les épices (Goryacheva *et al.*, 2007) et le vin (Romeo-Gonzalez *et al.*, 2010), et

elle a également été signalée dans les fruits (pommes, oranges, prunes, fruits secs) et jus de fruits (jus de pomme, jus de raisin, jus d'orange). La présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour les hommes et animaux est réglementée dans de nombreux pays (FAO, 2004). En 2005, la Commission européenne a proposé la limite maximale de 2 microgrammes par litre d'OTA dans les vins et a interdit la commercialisation de vins dépassant cette valeur. Au cours des dernières années, l'OTA a fait l'objet de nombreuses études dans le monde entier en raison de ses risques pour la santé humaine et animale. De nombreuses autorités nationales et internationales de la santé publique, telles que la « Food and Drug Administration » (FDA) des États-Unis, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation pour l'agriculture de l'alimentation (FAO) et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), accordent une attention particulière aux contaminations des denrées alimentaires et des aliments pour animaux et ont résolu ce problème mondial en adoptant des directives réglementaires strictes pour les principales classes de mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments de la filière animale (Alshannaq et Yu, 2017). L'OTA possède de très fortes propriétés néphrotoxiques, carcinogènes, tératogènes et immunosuppressives, en raison desquelles elle est classée par le Centre International de Recherche sur le Cancer dans le groupe 2B (probablement cancérigène) (CIRC, 2017).

Avec le développement des techniques analytiques, la présence d'OTA a été mise en évidence dans plusieurs aliments tels que les céréales, les grains de café et dans différents fruits (Covarelli *et al.*, 2012). La présence de ces toxines a été reliée à leur contamination par des champignons du genre *Aspergillus* et *Penicillium* (El khoury et Atoui, 2010). En effet, les fruits et les légumes sont recouverts d'une multitude de champignons à l'état de spores qui peuvent proliférer aisément si les conditions leur sont favorables. Les fruits sont souvent altérés par des *Penicillium*, tels que *P. digitatum* et *P. verrucosum* qui se développent sur les agrumes. Il faut également porter une attention particulière à certains produits tels que les jus de pommes, les compotes ou les petits pots pour bébés dans lesquels des pommes pourries risquent d'être mélangées à des pommes saines et peuvent de ce fait augmenter le risque d'une contamination par la patuline provenant de *P. expansum* (Bissessur *et al.*, 2001). Les espèces *Aspergillus niger*, *A. tubingensis* et *A. carbonarius* sont capables de produire l'ochratoxine A (OTA) et la fumonisine B2 (FB2) au cours de leur croissance (Battilani et Pietri, 2002; Béjaoui *et al.*, 2006; Filali *et al.*, 2001; Ospital *et al.*, 1998; Somma *et al.*, 2012).

Bien que l'application de fongicides reste l'un des outils les plus puissants et les plus rentables pour réduire l'incidence des agents pathogènes fongiques dans la plupart des cultures (Haidar *et al.*, 2016), l'Union Européenne a mis en place une législation stricte en ce qui concerne leur

utilisation à cause du développement de souches fongiques résistantes et des effets négatifs des fongicides sur la santé humaine et l'environnement (De Costa et Bezerra, 2009). Des limites maximales de résidus de pesticides ont été établies pour tous les aliments destinés à la consommation humaine ou animale dans l'Union Européenne (Commission Européenne, 2013). Reconnaissant le danger réel de la présence de produits chimiques ou de fongicides dans les aliments pour l'homme et les animaux (propriétés cancérigènes), les agriculteurs et les consommateurs se tournent de plus en plus vers les pratiques biologiques et la consommation de produits naturels et sains (Mie *et al.*, 2017).

La lutte biologique est l'une des alternatives les plus prometteuses aux fongicides synthétiques impopulaires, et les recherches sur le biocontrôle post-récolte ont augmenté au cours des dernières décennies (Droby *et al.*, 2009). Les principales caractéristiques d'un agent de biocontrôle idéal ont été définies par Wilson et Wisniewski (1989) et sont liées à la biosécurité, à l'activité dans divers environnements et à divers agents pathogènes, ainsi qu'à la facilité de gestion et d'utilisation. Les membres des genres *Bacillus* (Kumar *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013), *Pseudomonas* (Cirvillieri *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 1999) et *Pantoea* (Nunes *et al.*, 2002), entre autres, se sont révélés efficaces dans la lutte biologique contre la pourriture des moisissures. *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* ont montré une capacité significative dans la lutte biologique contre les bactéries (Bressan, 2003; Fravel, 2005). Les bactéries du genre *Bacillus* ont une grande capacité de production de métabolites secondaires dotés d'une activité antimicrobienne, principale source de leur potentiel antagoniste vis-à-vis des agents pathogènes présents dans les tissus végétaux (Rückert *et al.*, 2011). Les composés antimicrobiens à structure circulaire lipopeptidique, produits par de nombreuses souches du genre *Bacillus*, ont démontré une activité antifongique et antibactérienne significative (Dimkic *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2002).

Dans ce contexte, la présente thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Micologie, Pathologies et Biomarqueurs de la Faculté des Sciences de l'université Tunis El Manar en Tunisie, et l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE) rattachée à l'INRA de Bordeaux et à Bordeaux Sciences Agro, et vient compléter les travaux effectués sur la lutte biologique contre les champignons ochratoxinogènes en Tunisie afin de développer des moyens novateurs et efficaces de lutte contre des micro-organismes toxiques qui sont responsable de pathologies des animaux et l'homme. Les objectifs de la présente thèse sont : (i) d'isoler et d'identifier les principaux champignons pathogènes responsables de la production de l'ochratoxine A et de la contamination des raisins et des pommes aux champs et

en post-récolte en Tunisie ; (ii) quantifier leur production d'OTA afin d'évaluer leur pouvoir toxigène. (iii) Isoler et identifier des souches bactériennes colonisant les sols des vignobles tunisiens afin d'étudier leur potentiel antagoniste. (iv) Réaliser des essais de lutte biologique contre des moisissures toxigènes en utilisant deux fruits cibles, *i.e.* les raisins et les pommes.

Synthèse

Bibliographique

1. Mycotoxines

1.1. Définition et généralités

Le terme « mycotoxine » a pour origine la combinaison des termes « *mycos* » qui signifie champignon en grecque et « *toxicum* » qui signifie poison en latin (Jouany *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2012). Les mycotoxines sont des contaminants naturels, définies comme étant des métabolites secondaires toxiques, elles sont produites par une large gamme d'espèces de champignons filamenteux, principalement ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps* (Marin *et al.*, 2013). Ces métabolites sont universellement présents dans les aliments et les denrées alimentaires d'origine animale ou végétale, et retiennent aujourd'hui l'attention des milliers de chercheurs dans le monde entier, afin de mener des études sur leur origine, toxicité, voie de biosynthèse, et surtout sur les stratégies de contrôle de leur biosynthèse. La santé humaine et animale est gravement affectée non seulement par la présence de concentrations élevées de mycotoxines dans les aliments, mais aussi par la durée d'exposition, le type de mycotoxine et de mécanisme d'action, tout en prenant en compte le métabolisme de l'espèce concernée et son mécanisme de défense (Hussein *et* Brasel, 2001).

Les mycotoxines ont été découvertes dans les années 1960 après la mort de 100 000 dindes en Angleterre suite à une infection due à une nécrose hépatique sévère (Bennett *et* Klich, 2003). Cette tragédie a été attribuée à la présence de concentrations trop élevées d'aflatoxines dans les arachides fournies à ces volailles (Medeiros *et al.*, 2012).

A l'heure actuelle 300 mycotoxines ont été identifiées, mais seulement une vingtaine d'entre elles ont montré un profil toxicologique préoccupant pour l'homme et l'animal, dont six familles de mycotoxines fréquemment rencontrées dans les filières agro-alimentaires : l'aflatoxine, la patuline, l'ochratoxine, la fumonisine, les tricothécènes et la zéaralénone (Hendrickse *et al.*, 1982).

1.2. Voie de biosynthèse des mycotoxines

Du point de vue chimique, les mycotoxines sont des molécules de faible masse moléculaire (<1000 Daltons) (Bennett *et* Klich, 2003). Ces mycotoxines sont issues de différentes voies métaboliques classées en 5 catégories, selon leur structure et leur précurseur : les polycétides synthèses (PKS), les terpènes cycliques (TC), les peptides cycliques non-ribosomiques (NRPS), les indoles alcaloïdes (DMATS) et les hybrides PKS/NRPS (Keller *et al.*, 2005) (Fig. 1).

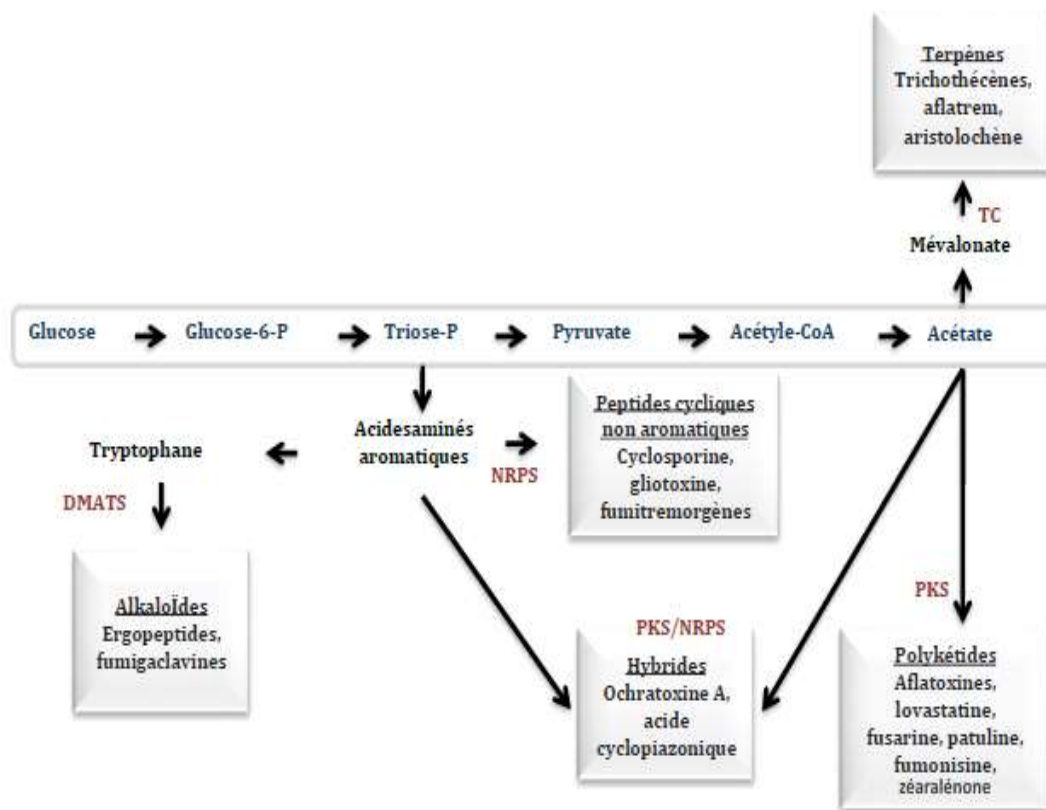


Figure 1. Les différentes voies métaboliques des mycotoxines. NRPS : peptide synthétase non ribosomiques; PKS : polycétide synthase ; TC : terpènes cyclase ; DMATS : diméthylallyl transférase (El Khoury, 2017).

La biosynthèse des métabolites secondaires fongiques commence par un précurseur, le triose-P ou l'acétate, en fonction de la nature du produit final. Le triose-P aboutit à la formation des acides aminés aromatiques qui sont la base des peptides cycliques tels que la cyclosporine (métabolite secondaire utilisé dans le domaine de la médecine), la gliotoxine et la fumitremorgène (deux mycotoxines produites par *A. fumigatus*) (Boudra, 2002; Gardiner *et* Howlett, 2005). Les acides aminés aromatiques sont eux même des précurseurs du tryptophane, qui en présence de l'enzyme diméthyl allyle transférase sera transformé en alcaloïdes (ergopeptides et fumigaclavines) généralement produits par des champignons appartenant au genre *Claviceps*.

L'acétate, le deuxième précurseur de la production des métabolites secondaires fongiques, conduit à la formation du mévalonate des polycétides. En présence de l'enzyme terpène cyclase, le mévalonate donne des terpènes (trichothécènes, aflatrem et aristolochène). Les polycétides, formés par l'intermédiaire des PKS, sont la base de plusieurs mycotoxines, telles que l'aflatoxine, la fusarine, la zéaralénone, la patuline et la fumonisine (Yu *et al.*, 2004; Gaffoor

and Trail; 2006; Puel *et al.*, 2010). Ces dernières sont produites par des champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*.

Quant à la formation de l'OTA et de l'acide cyclopiazonique, ces deux toxines exigent l'implication des polycétides et des acides aminés aromatiques. Ce type de mycotoxines est nommé « hybride » et nécessite le travail des deux types d'enzymes PKS et NRPS, afin de former la molécule finale (Gallo *et al.*, 2014).

1.3. Occurrence et toxicité des mycotoxines

Une fois détectées dans les denrées alimentaires, les mycotoxines peuvent affecter la santé de l'homme ainsi que celle de l'animal. En effet, l'exposition aux mycotoxines se manifeste suite à la consommation des aliments contaminés par voie directe, par inhalation/ingestion des moisissures et/ou par des mycotoxines dépassant les seuils autorisés, ou par voie indirecte, suite à la consommation des produits dérivés des animaux contaminés, notamment la viande, le lait et les œufs, contenant des mycotoxines ingérées par ces animaux.

Les syndromes causés suite à une ingestion ou une inhalation de mycotoxines par l'homme ou l'animal, sont appelés des « mycotoxicoses » (AFSSA, 2009). Une des mycotoxicoses les plus importantes est « l'ergotisme », définie comme étant le résultat d'un empoisonnement suite à l'ingestion à long terme d'alcaloïdes issus de l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*), un champignon qui infecte le seigle et d'autres céréales. L'ergotisme connu depuis les années 1750 sous le nom de « Feu de Saint Antoine », est devenu épidémique en Europe centrale durant le Moyen Age. Un autre exemple de mycotoxicose est l'aleucie toxique alimentaire (ATA), une maladie historique qui a causé la mort de milliers de Russes en 1940 en provoquant de graves fièvres, des saignements de la peau, du nez et des gencives, ainsi que des nécroses et des répressions du système immunitaire avec une mortalité arrivant jusqu'à 80% (Nelson *et al.*, 1994). Plus tard, dans les années 1960, l'aflatoxine a été découverte suite à la mort de 100 000 dindes en Europe (Bennett *et Klich*, 2003). Le Tableau 1 résume les principales mycotoxines, leurs effets sur la santé, ainsi que les denrées et les commodités qu'elles contaminent.

Les maladies aiguës et les maladies chroniques causées par ces mycotoxines dépendent de leurs concentrations et surtout du degré de toxicité propre à chaque mycotoxine. Chez les animaux, les maladies aiguës sont celles reliées à l'endommagement des reins et du foie, aux attaques du système nerveux central, ainsi qu'aux maladies de la peau et du système hormonal.

Tableau 1. Les principales mycotoxines ainsi que leurs effets possibles sur la santé de l'homme et leur occurrence dans les aliments et les denrées alimentaires (CAST, 2003; AFSSA, 2009).

Mycotoxines	Effets possibles sur la santé humaine	Denrées alimentaires
Aflatoxines (Lunn <i>et al.</i> , 1999; Leong <i>et al.</i> , 2010)	Maladies reliées au foie (hépatotoxique, hépatocancérogène), effets cancérigènes et tératogéniques, hémorragies (tractus intestinal, rénal), répressions immunitaires	Arachides, noisettes, céréales (maïs), lait, épices
Fumonisines (Chu and Li, 1994; Edrington <i>et al.</i> , 1995)	Œdèmes pulmonaires, néphro- et hépatotoxique, répressions immunitaires	Maïs
Tricothécènes (Arunachalam and Doohan, 2013; Pettersson, 1995)	Dérèglements digestifs (vomissements, diarrhées), perte de masse, hémorragies (estomac, cœur, intestin, poumons, vessie), lésions orales, dermatite, infertilité, dégénérescence de la moelle osseuse, répressions immunitaires	Céréales (blé, orge)
Zéaralénone (Maragos, 2010; Zinedine <i>et al.</i> , 2007)	Estrogéniques, œdème de la vulve, prolapsus du vagin, élargissement de l'utérus, atrophie des testicules, atrophie des ovaires, infertilité, avortement	Maïs, blé
Ergots alcaloïdes (Bacon <i>et al.</i> , 1986; Alderman <i>et al.</i> , 1998)	Gangrènes, hallucinations, convulsions	Seigle
Patuline (Cano-Sancho <i>et al.</i> , 2009; Mahfoud <i>et al.</i> , 2002)	Mutagéniques, génotoxiques, carcinogéniques	Fruit (pommes, poires)
Ochratoxines (Heussner and Bingle, 2015; Studer-Rohr <i>et al.</i> , 1995)	Néphrotoxiques, carcinogéniques, répressions immunitaires	Céréales (blé, maïs), vin, raisin, jus de raisin

Cependant, les maladies chroniques se manifestant principalement par une cytotoxicité, génotoxicité (principalement causée par l'AFB1), immunotoxicité et une mutagénicité, présentent de véritables soucis sur la santé de l'homme. Ces maladies chroniques sont dues à une consommation régulière journalière et/ou d'une quantité mineure de mycotoxine pendant une longue période, causant avec le temps, l'apparition de troubles de façon insidieuse (Bryden, 2007). L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classifié ces dernières en des Groupes, selon le degré de cancérogénicité de chacune, afin de mieux évaluer les risques de chaque mycotoxine (IARC, 1993). C'est ainsi que l'aflatoxine B1 (AFB1) a été classifiée comme étant un agent cancérigène pour l'homme : Groupe 1 (Boermans and Leung, 2007). L'OTA constitue le Groupe 2B regroupant les agents « potentiellement cancérogènes pour l'homme ». La patuline et la zéaralénone, sont classées en Groupe 3 : non cancérigènes pour l'homme.

1.4. Règlementation et législation

Compte tenu des effets dangereux sur la santé humaine et animale provoqués suite à une intoxication par les mycotoxines, l'Union Européenne (UE) a adopté une législation établissant les teneurs maximales de certains contaminants dans les denrées alimentaires afin de garantir un niveau élevé de santé publique (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006 du 19 décembre 2006). Ce règlement établit les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, notamment pour protéger la santé des personnes les plus vulnérables, comme les enfants, les personnes âgées et les femmes enceintes. Les denrées alimentaires présentant une teneur en l'un de ces contaminants supérieures à celles prévues à l'annexe du règlement ne peuvent être proposées à la vente. Ces plafonds couvrent les parties comestibles de ces denrées et s'appliquent également aux denrées composées, transformées, séchées ou diluées. Le règlement établit également les valeurs minimales de contaminants pouvant raisonnablement être atteintes grâce au respect des bonnes pratiques dans le domaine de la fabrication, de l'agriculture et de la pêche (ALARA, c'est-à-dire « à un niveau aussi bas que raisonnablement possible»). Le Tableau 2, regroupe les informations concernant les niveaux autorisés de mycotoxines dans les aliments selon l'UE.

Tableau 2. Niveaux de mycotoxines autorisés par l'Union Européenne (UE) dans les aliments et les denrées alimentaires qu'elles contaminent (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006).

Mycotoxines	Variétés alimentaires	Concentration autorisée (µg/kg)
AFB1	- Cacahuètes et autres oléagineux ainsi que les produits finis destinés à la consommation humaine	2.0
	- Cacahuètes et autres oléagineux destinés à des traitements physiques avant d'être consommés par l'homme	8.0
	- Fruits secs, à l'exception des figues sèches, ainsi que les produits finis destinés à la consommation humaine	2.0
OTA	- Céréales qui n'ont subi aucun traitement	5.0
	- Raisin sec	10.0
	- Vins (comprenant les vins mousseux, à l'exception des vins de liqueurs, et les vins dont le degré alcoolique dépasse les 15% vol), ainsi que les vins fruités	2.0
	- Jus de raisin, jus de raisin concentré, nectar et moût de raisin, destinés à la consommation humaine	2.0
	- Grains de café torréfiés ainsi que le café torréfié moulu	5.0

	- Jus de fruits, jus de fruits concentré, et le nectar des fruits	50.0
PAT	- Jus de pomme et les produits de pommes, comprenant la compote ainsi que la purée de pommes, destinés à la consommation infantine	10.0
	- Les boissons spiritueuses, le cidre et d'autres produits fermentés à base de pommes ou contenant du jus de pomme	50.0
	- Céréales qui n'ont subi aucun traitement	100.0
ZEA	- Pain, pâtisseries, biscuits et céréales, à l'exception du maïs	50.0
	- Produits issus de la transformation du maïs destinés à la consommation infantine	20.0
FUM B1+B2	- Maïs n'ayant subi aucun traitement	4000.0
	- Céréales du petit déjeuner à base de maïs	800.0

2. Ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA), ainsi que les ochratoxines B et C, sont des mycotoxines produites principalement par des champignons appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Parmi ces mycotoxines, l'OTA est la plus abondante et la plus toxique. Les principales sources d'OTA sont les céréales, le jus de raisin et le vin rouge, le café, le cacao, les fruits à écale, les épices et les fruits secs. La contamination peut aussi se transmettre à la viande de porc, aux produits à base de sang de porc et à la bière. *Penicillium spp.* est la source principale de contamination par l'OTA des produits alimentaires stockés dans les climats tempérés (Yahia, 2009), tandis que les *Aspergillus spp.* dominant dans les pays aux climats plus chauds (El khouey et Atoui, 2010).

2.1. Historique

L'OTA a été isolée pour la première fois en 1965 à partir d'*Aspergillus ochraceus*, à l'occasion d'un screening sur des moisissures toxigènes réalisé par une équipe de chercheurs Sud-Africains au cours d'une recherche systématique destinée à la découverte de nouvelles mycotoxines (Van der Merwe, 1965). Elle a par la suite été identifiée dans des conditions naturelles aux USA en 1969, dans un échantillon de maïs (Weidenburner, 2001), puis dans l'ensemble des pays du monde. Le premier champignon classé ochratoxinogène est *A. ochraceus*, mais plus tard, des études plus pointues ont montré que plusieurs espèces au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium* appartenaient aussi à cette catégorie (Ciegler *et al.*, 1972; Abarca, 1994; Horie, 1995).

2.2. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA

L'OTA est un pentakétide dérivé de la famille des hydrocoumarines, couplé à un acide aminé, le L- β -phénylalanine sur le carbone portant le groupe carboxyle. La nomenclature officielle de cette molécule selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (UICPA) est : L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1*H*-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-(*R*)-isocoumarine (Ringot, 2006).

La formule brute de l'ochratoxine A est : C₂₀H₁₈ClNO₆

Son numéro de CAS est 303-47-9 [IARC, 1993].

Sa dénomination scientifique est :

L-Phénylalanine,N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1*H*-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-, (*R*)- [IARC, 1993, Weidenburner, 2001].

Ou encore :

N-[[*(3R)*-5-Chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phényl-L-alanine

L'OTA est constituée d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine liée, par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carbonyle en C7 au groupement amine de la L-phénylalanine. Sa structure chimique est représentée dans la Figure 2.

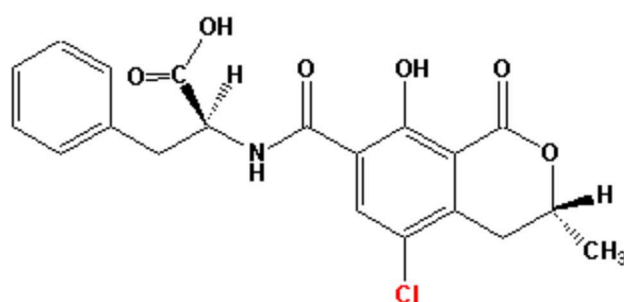


Figure 2. Structure chimique de l'OTA. Schéma adapté de El Khoury and Atoui (2010).

L'OTA est un acide organique faible avec un pKa de 7,1 (Bredenkamp *et al.*, 1989; Miller, 1999) et une masse molaire de 403,8 g/mol. De structure cristalline variant de l'incolore au blanc, elle possède une intense fluorescence en lumière UV, de couleur verte en milieu acide et bleue en milieu alcalin (IARC, 1993; Budavri, 1989).

L'OTA est une molécule chimiquement stable et résistante aux températures très élevées : elle peut résister pendant 3 heures à une température stérilisante de 121 °C sous haute pression (Trivedi *et al.*, 1992; Boudra *et al.*, 1995). Ainsi, son élimination de denrées alimentaires contaminées reste jusqu'à présent très difficile (El Khoury *et Atoui*, 2010). Son point de fusion est de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène (IARC, 1983). A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle est soluble et stable dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (0,1 M; pH 7,4) ainsi que dans les solutions alcalines aqueuses en général. Ces propriétés sont à la base de plusieurs méthodes d'extraction. Le mode d'extraction est fondé sur l'état d'ionisation de l'OTA en fonction du pH. En effet, en milieu acide, cette mycotoxine n'est pas ionisée, donc soluble en phase organique. Par contre, en milieu basique, elle se présente sous forme ionisée soluble en milieu aqueux (Pohland *et al.*, 1992).

2.3. Techniques d'analyse

Le dosage de l'OTA se réalise en trois étapes : l'extraction, la purification et la quantification. Les échantillons solides sont broyés et homogénéisés, puis l'extrait est centrifugé et décanté. Pour les substrats liquides, le broyage n'est pas nécessaire. Une purification sur colonne de l'échantillon à doser peut alors être réalisée. Après filtration et/ou centrifugation, l'extrait est dilué, puis purifié sur colonne d'immuno-affinité. L'aliquot obtenu peut alors être analysé par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (CLHP).

2.3.1. Protocole de dosage de l'OTA par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Des méthodes rapides de détection de l'OTA sont actuellement disponibles sous forme de « kits » : ceux-ci utilisent un anticorps anti-OTA. Le seuil de détection de cette méthode immuno-enzymatique est près de 10 pg/ml de sérum (Pfohl-Lezzkowicz, 1993b).

2.3.2. Dosage de l'OTA par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La détection et la quantification de la mycotoxine peuvent se réaliser sous lampe UV ou, mieux, par fluorescence. Plusieurs protocoles analytiques ont ainsi été développés par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2002), notamment pour la recherche d'OTA dans l'orge ou le café. La limite de détection est de l'ordre du µg/kg. Les coefficients de variation entre les différents laboratoires varient entre 31 et 54%.

La lecture peut se faire visuellement par comparaison des intensités avec des solutions étalons ou bien grâce à un lecteur de fluorodensitométrie, excitation : 310-340nm, émission : 440-475nm. La fluorescence de l'OTA peut être renforcée, elle vire au bleu intense en présence de vapeurs d'ammoniac ou par vaporisation d'une solution basique (soude, bicarbonate).

2.3.3. Dosage de l'OTA par Chromatographie Liquide Haute performance (CLHP)

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) est de plus en plus utilisée. Elle constitue la méthode de référence (Azemar, 2000). Le système CLHP est muni d'une colonne analytique de type C-18, 5 µm et la phase mobile, délivrée à un débit de 1 ml/min, est composée d'acétonitrile/eau/acide acétique (99:99:2, v/v/v). L'acidification de la phase mobile est indispensable sinon l'OTA s'éluerait avec le front de solvant. La détection par fluorescence est directement possible (excitation : 335 nm et émission : 465 nm). La plus faible teneur validée est 1 µg/kg sur des matrices telles que blé, orge ou seigle.

2.4. Profil Toxicologique

Le profil toxicologique de l'OTA a été largement étudié dans de nombreuses études au cours des années (Haighton *et al.*, 2012; O'Brien and Dietrich, 2005; El Khoury and Atoui, 2010; Mally, 2012; Vettorazzi *et al.*, 2014), et a fait l'objet d'une monographie complète par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) en 1993. À la suite de la découverte des néphropathies spontanées humaines et animales, des études expérimentales ont été menées afin de démontrer l'implication de l'OTA dans ces maladies. L'OTA est la mycotoxine la plus dangereuse appartenant à la famille des ochratoxines. Des études toxicologiques réalisées sur des animaux de laboratoire (Zimmerli et Dick, 1996; Ospital *et al.*, 1998; Visconti *et al.*, 1999; Otteneder *et al.*, 2000; Shephard *et al.*, 2001; Da Rocha Rosa *et al.*, 2002) ont montré que cette toxine peut avoir plusieurs effets, tels que des effets cancérigènes, néphrotoxiques, génotoxiques, immunosuppresseurs, neurotoxiques et tératogènes. Sa toxicité reste cependant très variable et dépend du sexe, de l'espèce et du type cellulaire (O'Brien *et al.*, 2005).

2.4.1. Cancérogenèse

Plusieurs études ont porté sur le développement de cancers expérimentaux chez des animaux qui ont été nourris pendant quelques semaines par l'introduction de doses variables d'OTA. Il s'agit de tumeurs hépatiques mais surtout rénales (Huff *et al.*, 1992). Ainsi, l'OTA peut entraîner, chez les rongeurs, la formation de cancers du rein, du foie et des glandes mammaires.

Il a été rapporté qu'une alimentation contaminée par cette toxine induit des adénomes rénaux et des carcinomes hépatocellulaires chez les souris et les rats, et elle est suspectée d'avoir des effets homologues chez les êtres humains surtout que sa durée de vie chez ces derniers est dix fois plus longue que chez les rats (Eskola, 2002). Suite à ces études, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé l'OTA comme une molécule cancérigène pour les humains (groupe 2B) (IARC, 1993).

2.4.2. Génotoxicité

L'OTA a longtemps été considérée comme non génotoxique, les tests de mutagénicité ayant donné des résultats peu concluants. Dès la fin des années 1990, une théorie différente a été adoptée suite aux travaux effectués par Henning *et al.* (1991) qui ont mis en évidence une activité mutagène importante de l'OTA métabolisée par des hépatocytes sur des souches bactériennes *Salmonella typhimurium* TA1535 et 1538, ainsi que sur des lymphocytes humains (*in vitro*). Ils ont observé une augmentation de l'incidence des échanges de matériel génétique entre chromatides sœurs. La preuve de la génotoxicité de l'OTA a été démontrée par l'utilisation de systèmes *in vivo*. Des cassures de simple-brin ont été observées au niveau de l'ADN du rein, du foie et de la rate des rongeurs, ainsi que des aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence de 15 mM d'OTA. Ce type d'aberration se retrouve chez les patients souffrant de la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) (Monolova *et al.*, 1990). Les adduits à l'ADN causés par l'OTA ont été mis en évidence dans plusieurs études de génotoxicité (Pfohl-Leskowicz *et al.*, 2007). D'autres travaux publiés confirment que l'activité cytotoxique de l'OTA conduirait à des lésions de l'ADN (Gautier *et al.*, 2001; Zepnik *et al.*, 2001; Gross-Steinmeyer *et al.*, 2002). Toujours concernant la toxicité de l'OTA, des études réalisées par El Adlouni *et al.* (2006) ont permis d'observer que la biotransformation de cette mycotoxine implique le cytochrome P450-dépendant qui génère, par libération de radicaux libres et l'implication de certaines enzymes, une peroxydation des lipides et une formation d'intermédiaires métaboliques toxiques actifs qui se manifestent au niveau de la coagulation sanguine, du métabolisme glucidique, de lésions oxydatives et de l'inhibition de la protéosynthèse par inhibition de l'ARNt synthétase.

Durant la dernière décennie, les études menées sur le pouvoir carcinogénique de l'OTA ont attribué cet effet au mécanisme génotoxique indirect de cette molécule (mécanisme épigénique), relié au stress oxydatif, à la prolifération cellulaire compensatoire et à l'interruption des signaux de division cellulaire (Mally *et Dekant*, 2009; Rumora *et Žanić*

Grubišić, 2009; Vettorazzi *et al.*, 2013). Les études doivent se poursuivre pour connaître précisément le mode d'action de l'OTA et de ses métabolites dans son pouvoir génotoxique.

2.4.3. Néphrotoxicité

La néphropathie est l'effet toxique majeur de l'ochratoxine A. Cette molécule est potentiellement néphrotoxique chez tous les mammifères non ruminants (Ribelin *et al.*, 1978). L'OTA a été associée à l'ochratoxicose des poulets et des porcs (néphropathie porcine liée aux mycotoxines, MPN) classée parmi les maladies causant des pertes économiques mondiales (Huff *et al.*, 1974; Elaroussi *et al.*, 2006; Stoev *et al.*, 2010a; Stoev *et al.*, 2010b), et caractérisée par un endommagement sévère des reins lié à la consommation des aliments contaminés en OTA (Goliński *et al.*, 1984; Stoev and Denev, 2013). Cette molécule a montré une grande affinité envers les protéines, plus particulièrement le sérum d'albumine (la Bovine Sérum Albumine ou BSA), favorisant ainsi sa bioaccumulation dans les organes des animaux, et par la suite sa transmission vers les animaux prédateurs. Par conséquent, les muscles, les produits des abats, le lait et parfois les œufs, peuvent être contaminés indirectement par l'OTA. L'OTA a également été associée à la néphropathie des humains (Ospital *et al.*, 1998; Lopez De Cerain *et al.*, 2002; Blesa *et al.*, 2004) et est suspectée en particulier d'être la cause de la Néphropathie Endémique des Balkan (NEB), maladie humaine fatale. Il s'agit d'une tubulonéphrite interstitielle chronique affectant la population dans certaines régions du Sud-Est Européen : Croatie, Bosnie, Bulgarie et Roumanie (Ospital *et al.*, 1998; Markaki *et al.*, 2001; Blesa *et al.*, 2004; Visconti *et al.*, 2008). Elle serait également mise en cause dans la Néphropathie Tunisienne (TCIN) (Hassen *et al.*, 2004) affectant la population en Tunisie.

2.4.4. Neurotoxicité

Des recherches effectuées sur des rats ont montré que l'administration d'OTA pendant la période de gestation induit des malformations du système nerveux central (Pfohl-Leszkowicz and Castegnaro, 1999). De même, Eskola (2002) et Soleas *et al.* (2001) ont rapporté que l'OTA peut être considérée comme cause possible de certaines lésions ainsi que des dégâts au niveau cérébral. Cette substance s'avère donc hautement toxique pour les cellules nerveuses comme elle est capable d'atteindre le tissu neural (cerveau, rétine) (Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2011).

2.4.5. Immunotoxicité

Dans certaines conditions, l'OTA présente un effet immunosuppresseur puissant, elle inhibe la prolifération des lymphocytes périphériques T et B et stoppe la production d'interleukine 2 (IL2) ainsi que ses récepteurs (Lea *et al.*, 1989). Des nécroses des tissus lymphoïdes ont été rapportées (Creppy *et al.*, 1991) ainsi qu'une atteinte de l'immunité humorale et cellulaire (Holmberg *et al.*, 1992). Pfohl-Leszkowicz, (2011) affirme que l'OTA supprime l'activité des cellules tueuses (Killer) ainsi que la production d'interféron. En effet, l'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et de la réponse immunitaire.

Ainsi, cette molécule peut être à l'origine de lymphopénie, régression du thymus et suppression de la réponse immunitaire.

Suite à toutes les recherches faites, l'OTA est clairement donnée comme agent immunosuppresseur (Petzinger *et al.*, 2002).

2.4.6. Tératogénicité

L'administration d'OTA chez l'animal est tératogène. Elle peut traverser le placenta et provoquer des anomalies morphologiques diverses chez les embryons de rat, souris, hamster, porc et poulet (Moré et Galtier 1978; Pfohl-Leszkowicz, 2011). Toutefois, la gravité des malformations dépend de la voie d'administration et de la période gestative. Les mécanismes de la tératogénicité induite par l'OTA n'ont pas été clairement définis mais il semblerait que le développement embryonnaire soit affecté à la fois par un effet direct de la molécule sur le fœtus et par un effet indirect via la mère (Petzinger *et al.*, 2002).

3. Voies de synthèse de l'OTA

L'OTA est produite par différents champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, notamment *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum*, mais aussi, *A. sulphureus*, *A. ostianus* et *A. sclerotiorum* (Walker, 1999; Van Der Merwe *et al.*, 1965; Steyn & Holzapfel, 1967). Ces moisissures se développent principalement sur les céréales et les fruits. L'élaboration de l'OTA est assujettie à différents facteurs, biologiques, chimiques et physiques (D'Mello & Mac Donald, 1997). Après la contamination de l'aliment, quand les conditions de développement sont satisfaisantes, il y a germination des spores et croissance d'un mycélium. La reproduction sexuée se fait par l'intermédiaire de spores internes, il s'agit d'ascospores contenues dans des asques à l'intérieur de périthèces clos. La multiplication asexuée se fait par des conidies qui se forment sur le mycélium. La spore et le mycélium sont responsables de la

production de l'ochratoxine A. Dans le cas où les conditions de développement sont difficiles (faible humidité), les spores ne germent pas, il apparaît alors des hyphes cloisonnés mais d'une très faible toxicité. Si les conditions sont encore plus dures, les spores se transforment en chlamydospores très résistantes.

Les moisissures sont de formidables usines à produits chimiques naturels qui se distinguent dans leurs fonctions, leurs structures, et leurs voies de biosynthèse. Les mycotoxines sont les produits terminaux d'une cascade de réactions enzymatiques qui débutent quand des enzymes multi-modulaires comme les polycétides synthases (PKS), les peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) ou les terpènes synthases (TS), catalysent respectivement le réarrangement ou la condensation de métabolites primaires simples tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés ou les terpènes pour aboutir à des métabolites secondaires plus complexes (Khan *et al.*, 2014). En outre, en plus de ces enzymes principales, d'autres enzymes de modification sont nécessaires pour catalyser les réactions ultérieures dans les voies de biosynthèse. Ces enzymes fonctionnent au même moment de sorte que les nouveaux intermédiaires soient pris en charge par l'enzyme suivante jusqu'à aboutir au produit final qui est la mycotoxine. Ce phénomène est rendu possible par le fait que les gènes codant pour les enzymes d'une voie métabolique sont souvent liés physiquement ou regroupés en cluster les uns derrière les autres au niveau d'une même région chromosomique et sont tous soumis à l'action d'un facteur de régulation spécifique (Osborn, 2010).

Les mycotoxines sont regroupées en fonction de leur origine biosynthétique en trois catégories principales, à savoir les terpènes, les polycétides et les peptides cycliques non ribosomiques (Moretti *et al.*, 2013). En outre, une quatrième catégorie regroupant les peptides hybrides NRPS/PKS qui contiennent à la fois des unités peptidiques et polycétides, a été identifiée. La Figure 3 présente les différentes origines métaboliques des mycotoxines majeures.

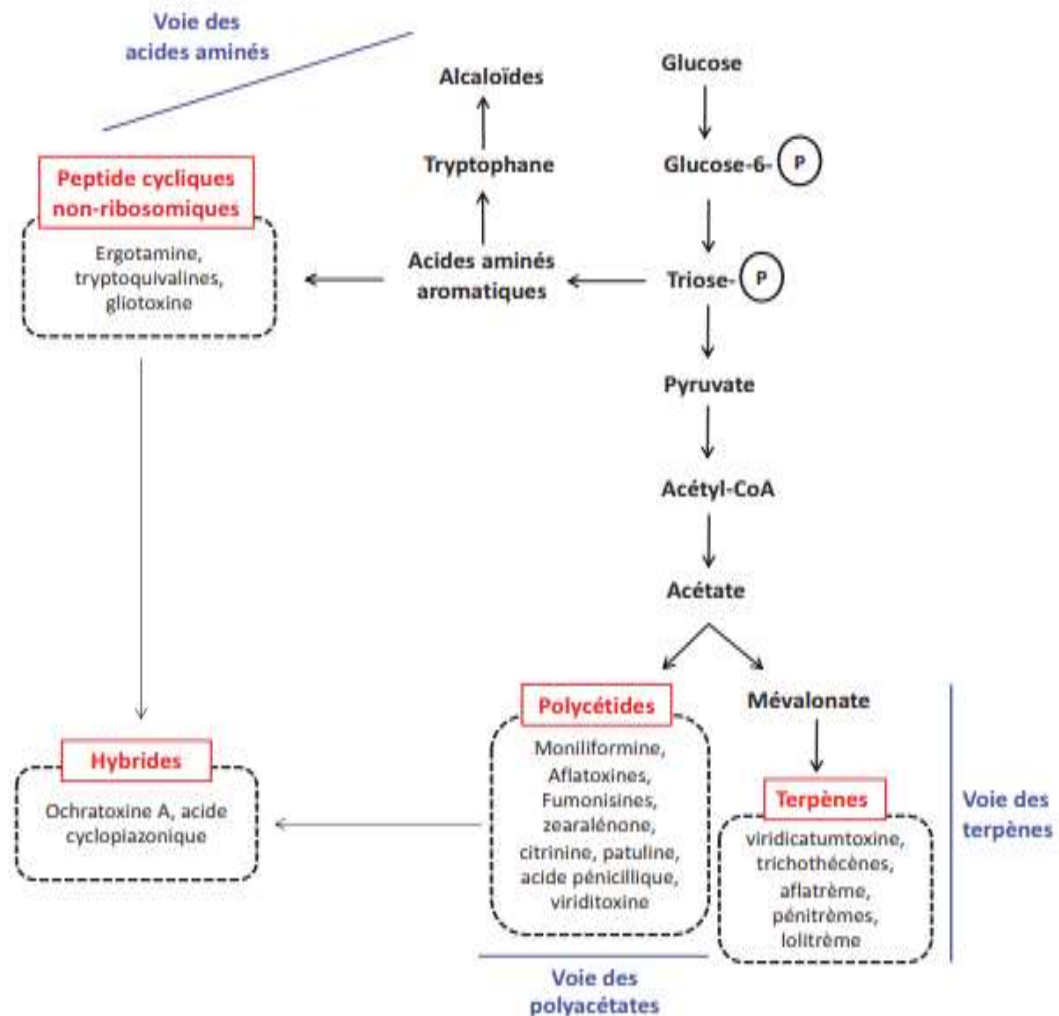


Figure 3. Origines biosynthétiques des mycotoxines majeures. En bleu sont montrées les trois voies de biosynthèse principales et en rouge les catégories biosynthétiques qui en découlent. Schéma adapté de Tabuc (2007), Leyral and Vierling (2007) et Bu'Lock (1980).

4. Principaux champignons producteurs d'ochratoxine A

Les champignons majeurs impliqués dans la chaîne alimentaire humaine et animale, connus comme précurseurs de l'OTA, appartiennent principalement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Delage *et al.*, 2003; Lopez De Cerain *et al.*, 2002; Filali *et al.*, 2001; Otteneder et Majerus, 2000; El khoury et Atoui, 2010).

L'OTA a été originellement décrite en 1965 comme métabolite d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Dans les années suivantes, la section « *Nigri* » est devenue également très importante vu l'ochratoxigénicité qui a été attribuée à certains de ses représentants : *A. carbonarius* (Horie, 1995; Wicklow *et al.*, 1996) et *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994; Ono *et al.*,

1995) sont considérés comme contaminants majeurs de certaines denrées tropicales et subtropicales surtout les raisins et dérivés (Zimmerli et Dick, 1996).

Des études antérieures ont montré que les espèces de *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines à des températures inférieures à celles nécessaires aux espèces d'*Aspergillus* (Weidenburner, 2001). L'espèce *P. verrucosum* est la principale espèce productrice d'OTA.

4.1. Le genre *Aspergillus*

C'est Michelli, qui en 1729, donne le nom d'*Aspergillus* aux moisissures qu'il observe au microscope : il leur trouve une ressemblance très marquée avec le goupillon (« aspergillus » en latin) dont on se servait à l'église.

La plupart des *Aspergillus* sont saprophytes et sont capables de se développer dans le sol et les détritiques, dans les composts et sur les végétaux malades. Ils colonisent des plantes déjà abîmées par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Mais ils sont également présents à la surface des graines. Dans de mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent évoluer et devenir des parasites. Les champignons appartenant à ce genre sont responsables de maladies chez l'homme et les animaux (aspergillose pulmonaire, allergies ou mycotoxicoses). Cependant ils sont aussi capables de produire des acides organiques et des pigments utiles en alimentation et en industrie (Schuster *et al.*, 2002).

4.1.1. Systématique

Les *Aspergillus* sont des champignons microscopiques filamenteux, qui vivent en saprobiose dans des nombreux écosystèmes. L'ensemble des filaments (ou hyphes) constitue le mycélium, dont le développement habituel comprend une phase végétative avec croissance et nutrition, et une phase de multiplication asexuée au cours de laquelle se forment des spores (ou conidies) qui assurent la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la formation d'un nouveau mycélium. De plus, une multiplication sexuée (reproduction) est connue chez certaines espèces d'*Aspergillus*. Les champignons du genre *Aspergillus* appartiennent au sous-embanchement des *Ascomycotina* par leur mode de reproduction sexuée (Fig. 4).

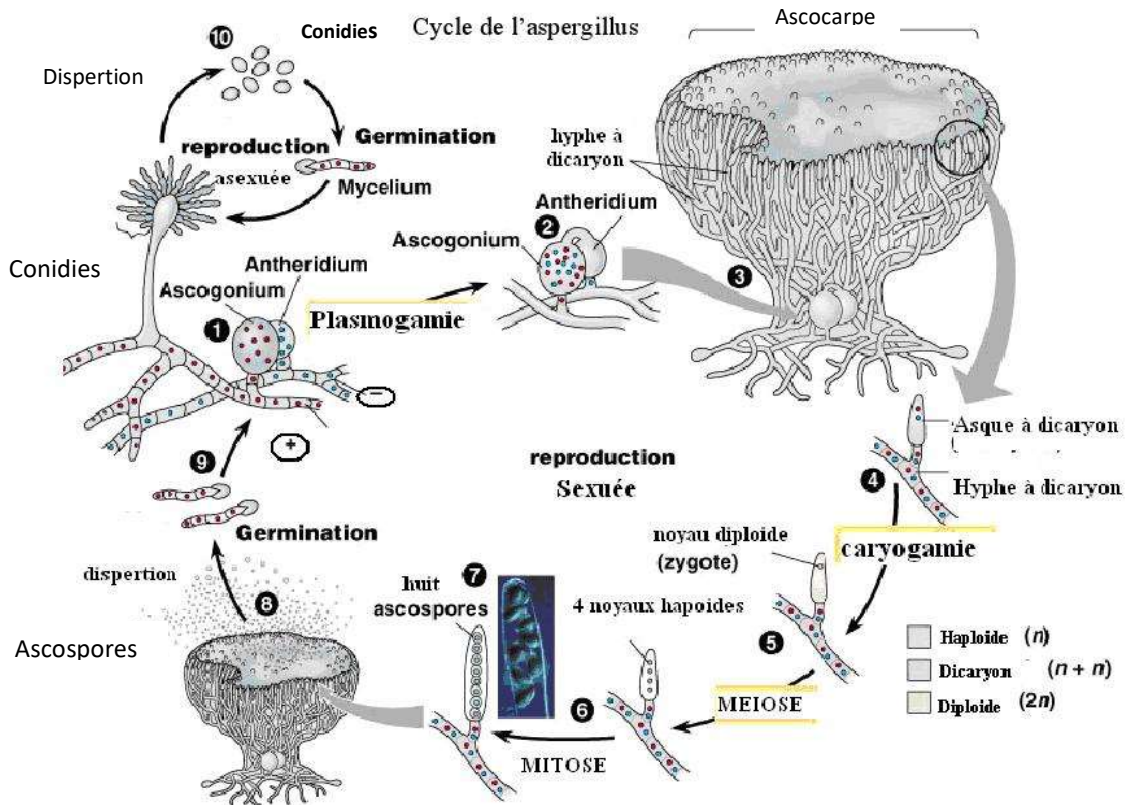


Figure 4. Cycle de reproduction sexuée et asexuée d'*Aspergillus*. (Diguta, 2011).

-Stade asexué (*stade anamorphe*). Le mycélium végétatif est formé d'hyphes septés (=cloisonnés) colorés ou non. Une cellule hyphale à paroi épaisse donne naissance au conidiophore. Celui-ci se termine par une vésicule de forme allongée, elliptique ou globuleuse donnant naissance aux cellules fertiles conidiogènes portant les conidies. La zone fertile de la vésicule s'appelle le stérigmate. Il peut être unisériel : les cellules conidiennes naissent alors directement des phialides ; ou bisériel : présence des métules, *i.e.* éléments stériles situés sur une vésicule qui portent les phialides (Fig. 4).

- Stade sexué (*stade téléomorphe*), se caractérise par la présence de cléistothèces. Ce sont des formations sclérifiées à parois épaisses (Fig. 4).

4.1.2. *Aspergillus ochraceus* (*alutaceus* var. *alutaceus*)

Il s'agit d'un Deutéromycète de l'ordre des Hyphomycètes, de la famille des Monoliaceae. Les *Aspergillus ochraceus* poussent rapidement, ils sont poudreux ou duveteux, de couleur jaune. Ils se caractérisent par la formation d'organes de reproduction asexués : les têtes aspergillaires (Fig. 5). Le conidiophore de longueur variable, se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule globuleuse (Fig. 5), à partir de laquelle se forment des phialides,

soit directement, soit par l'intermédiaire de métules. Les phialides forment des conidies unicellulaires, basipétales disposées en chaînettes. Quelques espèces produisent des cléistothèces.

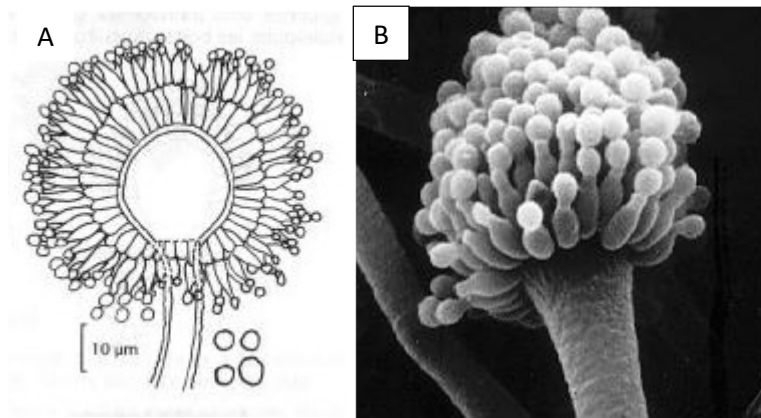


Figure 5. Tête aspergillaire d'*Aspergillus ochraceus* (A), en microscopie électronique (B) (El Khoury, 2011).

La culture de ce champignon permet de voir l'apparition rapide de colonies d'aspect granuleux et de couleur ocre (Fig. 6).



Figure 6. Aspect des colonies d'*Aspergillus ochraceus* sur milieu de culture synthétique MEA (INRA, 2015).

L'examen microscopique (Fig. 7) permet une identification précise par les caractéristiques de la tête aspergillaire le plus souvent bisériée et de forme radiaire.

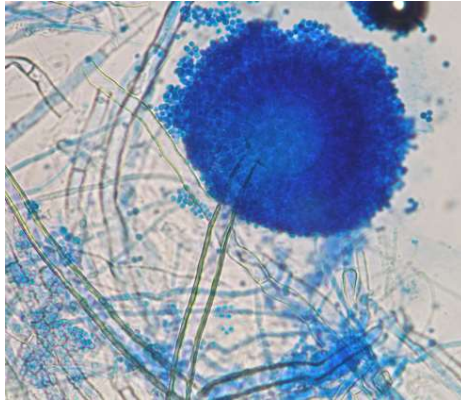


Figure 7. Tête aspergillaire d'*A. ochraceus* en microscopie optique (320x). (INRA, 2016)

4.1.3. *Aspergillus carbonarius*

Les champignons appartenant au groupe *Aspergillus* section *Nigri* (black *Aspergilli*) forment une alliance d'espèces de très grande importance dans les études de mycologie alimentaire, en biotechnologie et dans le domaine médical. *A. carbonarius* est un champignon filamenteux noir appartenant à cette section qui colonise les grains de céréales, de cacao et de café, les fruits (contaminant majeur des raisins) ainsi que les fruits secs (Joint, 2001; Cabañes *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2006b).

Son aspect macroscopique ne permet pas sa différenciation des autres « black *Aspergilli* », en raison des fortes ressemblances morphologiques macroscopiques entre les champignons noirs (Fig. 8).



Figure 8. Aspect des colonies d'*Aspergillus carbonarius* sur milieu de culture synthétique MEA (INRA, 2016).

Au niveau microscopique, *A. carbonarius* a une structure assez particulière (Fig. 9) : c'est un champignon bisérié ayant des conidiophores lisses de 2 à 3 µm de longueur, des vésicules sphériques de diamètre 60 à 90 µm, les métules sont de 12 à 18 µm et de très larges conidies de 6 à 8 µm de diamètre, noires et très rugueuses, voire pointues.

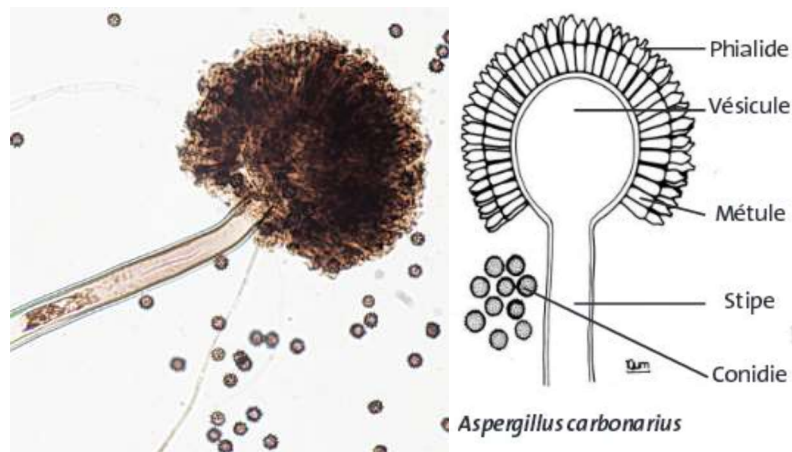


Figure 9. Aspect et structure microscopiques d'*A. carbonarius* (Diguta, 2011).

4.2. Le genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* comprend près de 150 espèces qui contaminent divers substrats organiques comme les céréales, les arachides et les fruits, mais qui sont également largement présentes dans le sol et l'environnement. Ces espèces ont des caractéristiques proches de celles du genre *Aspergillus* : ce sont des saprophytes considérés comme agents de contamination des denrées alimentaires (peuvent devenir parasites en présence d'humidité lors du stockage) ; ou utilisés comme agents de synthèse, de fermentation et de production d'antibiotiques (pénicilline, griséofulvine). Les *Penicillium* sont les organismes dominants des « moisissures bleues et vertes » associées au pourrissement des aliments, en particulier les fruits et les légumes. Les espèces appartenant au genre *Penicillium* produisent un certain nombre de mycotoxines telles que la patuline, l'acide pénicillique, la citrinine, la roquefortine C, la toxine PR, l'isofumigaclavine, l'acide mycophénolique et l'ochratoxine A.

4.2.1. Systématique

Les champignons appartenant à ce genre, présentent un thalle vert ou plus rarement blanc dont la texture est souvent utilisée comme critère de différenciation. Les conidiophores sont isolés ou groupés en faisceaux, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés et terminés par un pénicille. Ce dernier est constitué soit (Fig. 10) :

- d'un simple verticille de phialides : monoverticillé,

- d'un verticille de métules portant les phialides : biverticillé,
- de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications de métules et de phialides : terverticillé, quadriverticillé (Fig. 10).

Les phialides sont ampulliformes ou lancéolées. Les conidies peuvent être disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques, fusiformes, lisses ou rugueuses, de couleur grise ou verdâtre ou hyaline (El khoury *et al.*, 2006).

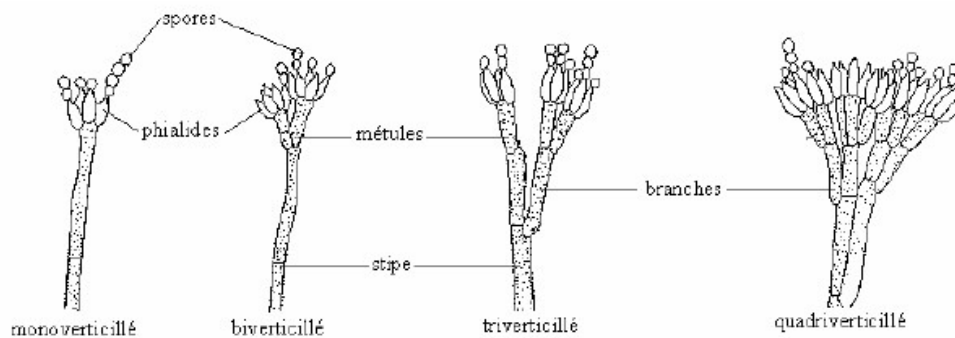


Figure 10. *Penicillium* mono, bi, tri et quadriverticillé (Diguta, 2011).

4.2.2. Habitat et niche écologique

Penicillium spp. sont des moisissures répandues dans l'environnement naturel, en particulier dans le sol (Demirel *et al.*, 2013), l'air et les intérieurs des maisons (Gutarowska *et al.*, 2012). En outre, ce champignon présente une gamme extrêmement large de matrices alimentaires qu'il est capable d'infecter pour puiser les nutriments dont il a besoin dans la matière organique (Demirel *et al.*, 2013), tout particulièrement les fruits à pépins (tels que pommes, poires, raisins, etc.) et les fruits à noyaux (cerises, pêches, prunes, etc.). A ces denrées s'ajoutent les noix, les légumineuses (arachides et fèves) et les céréales secondaires (telles que maïs, orge, soja et sorgho) (Nguyen 2007). Ce champignon est connu comme responsable potentiel de la pourriture des pommes.

4.2.3. *Penicillium verrucosum*

Ce sont des moisissures très communes dans les régions tempérées du monde (spécialement au nord de l'Europe). Les céréales (maïs, blé, orge) et les fruits sont les plus fréquemment contaminés. Une corrélation positive entre la teneur protéique de l'orge et la production d'OTA a même été établie (Weidenburner, 2001). Ce champignon est morphologiquement très distinctif.

La morphologie de ce champignon est influencée par le milieu de culture (Pitt and Hocking 2009) :

-Milieu MEA (Malt Extract Agar) (Fig. 11) : les colonies font 25-30 mm de diamètre avec un mycélium lisse et dans certains cas, des sillons radiaux espacés à modérément denses. La texture est veloutée, floconneuse au centre avec une marge translucide. Le mycélium est blanc ou marron. La conidiogénèse est modérée, de couleur jaune-vert similaire à celle observée sur milieu CYA (Czapek Yeast Agar), avec absence de pigments solubles ou d'exsudats. Le revers est similaire à celui obtenu sur milieu CYA ou quelques fois, de couleur jaune brun (Pitt and Hocking 2009).



Figure 11. Aspect macroscopique de *P. verrucosum* après 7 jours sur milieu MEA (INRA, 2015).

-Milieu CYA (Czapek Yeast Agar) (Fig. 12) : les colonies font 28-32 mm de diamètre avec un mycélium de texture veloutée à granuleuse ou moins souvent floconneuse. La présence de nombreux sillons radiaux peu profonds et d'un amas central est observée. La marge est blanche et étroite (1-2 mm). La conidiogénèse est modérée à forte et de couleur jaune-vert. Il y a une production d'exsudats de couleur jaune pâle, marron pâle ou rose pâle. Des pigments solubles sont parfois produits : orange ou marron-rouge. Le revers est orange-brun pâle (El khoury *et al.*, 2006).



Figure 12. Aspect des colonies de *P. verrucosum* après 7 jours sur milieu CYA (El khoury, 2011).

5. Principales plantes/fruits attaqués par *Aspergillus* et *Penicillium*

5.1. Les baies de raisins

Les raisins de table (*Vitis vinifera* L.) sont l'un des plus importants fruits thérapeutiques et économiques dans le monde. Cependant, 30 à 40% des raisins de table sont perdus chaque année après récolte en raison de la manipulation inadéquate et le manque de méthodes appropriées pour prévenir la pourriture (Hachem *et al.*, 2013; Prusky, 2011). Même dans les entrepôts frigorifiques (0° C), les raisins sont infectés par les moisissures bleues (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. et *Alternaria* spp.), moisissures grises (*Botrytis cinerea*), et pourriture rhizopique (*Rhizopus stolonifer*) (Thakur and Saharan, 2008; Senthil *et al.*, 2011; Romanazzi *et al.*, 2012), causant une estimation de pertes de raisins après récolte d'environ 39% du rendement et 30% de la valeur.

La microflore fongique est très diversifiée sur les grappes de raisins. Une étude menée en Californie sur les pourritures présentes sur baies a permis de mettre en évidence plus de 70 espèces fongiques appartenant à 30 genres différents (Hewitt, 1974 cité par La Guerche, 2004). Plusieurs auteurs (Serra *et al.*, 2005; Laforgue *et al.*, 2009) ont recensé plus de 50 genres différents isolés de baies de raisin dont les 7 plus fréquents sont : *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp. et *Rhizopus* spp.

Les facteurs environnementaux (climat, pratiques culturales...) sont à l'origine de cette variabilité, ce qui rend difficile toute généralisation. Les travaux ayant étudié la diversité fongique des raisins, se sont focalisés plus spécifiquement sur les moisissures productrices de mycotoxines et/ou responsables d'altération de la vendange : *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. et *Botrytis* spp. qui représentent les contaminants les plus présents sur baies de raisin et qui peuvent être la cause de pertes économiques importantes. En outre, *Aspergillus carbonarius* est connu comme contaminant majeur des raisins (Fig. 13). (Serra *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005). *Aspergillus ochraceus* est un champignon phytopathogène et cosmopolite, largement retrouvé

dans le sol et les végétaux en décomposition, il est responsable de la pourriture des raisins, pommes, poires... La pourriture fongique causée par *Aspergillus* spp. est également dangereuse pour la santé de l'homme en raison de la production d'ochratoxine A (OTA) (Ponsone *et al.*, 2007; Chiotta *et al.*, 2009),



Figure 13. Grappe de raisins contaminée par des moisissures du genre *Aspergillus* (Ephytia, INRA).

5.1.1. Ochratoxine A et filière raisin

Plusieurs travaux (Zimmerli et Dick, 1996; Visconti *et al.*, 1999; Castellari *et al.*, 2000; Markaki *et al.*, 2001; Otteneder et Majerus, 2000; El khoury et al., 2010), ont permis de mettre en évidence la présence de taux élevés de cette toxine dans le vin et le jus de raisin (7 µg/L). De plus, le vin a récemment été considéré comme étant la seconde source de contamination en OTA (10 à 15% de la prise totale en OTA) (Cabanès *et al.*, 2002; Stefanaki *et al.*, 2003; Shephard *et al.*, 2003; Otteneder et Majerus, 2000).

Cette présence d'OTA dans le vin a été expliquée par le fait que les raisins ont été contaminés au vignoble par différentes espèces de champignons ochratoxinogènes dont la production d'OTA augmente de plus en plus avec les étapes de maturation (Bejaoui *et al.*, 2006; Cabanès *et al.*, 2002; Da Rocha Rosa *et al.*, 2002; Markaki *et al.*, 2001). La date des vendanges aurait donc une incidence importante sur la teneur en OTA des baies et donc du moût. D'ailleurs, pour pallier les risques de contamination liés à une maturation trop avancée, les producteurs de jus de raisin préfèrent quand c'est possible, récolter des raisins en début de campagne. Les viticulteurs, en recherchant des taux de sucre élevés, ne peuvent pas adopter la même stratégie (El Khoury, 2006).

5.2. Les pommes

La pomme est le troisième fruit consommé dans le monde, après les agrumes et la banane. Il se récolte environ 80 millions de tonnes de pommes annuellement dans le monde, dont 40 millions de tonnes en Chine qui a multiplié par deux sa production en dix ans. C'est le fruit le plus cultivé en milieu tempéré (FAO, 2013).

Chez le pommier, les champignons infectent les fruits via les blessures et cause des pourritures graves. Dans ce cas, les parasites pénètrent dans les fruits par voie accidentelle aussi bien en verger qu'en entrepôt, leur développement est rapide et la pourriture commence à apparaître dès la contamination. Les plus importants de ces parasites sont *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* (Chapon et Westercamp 1996).

La part de la production de pommes entreposées dans les frigos subit malheureusement des détériorations suite à des problèmes phytosanitaires. Les pertes peuvent atteindre 60% et sont occasionnées essentiellement par des maladies d'origine fongique telle que *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Fusarium avenaceum*. Ces pertes économiquement importantes, agissent sur le prix de vente de la pomme, devenant souvent supérieur au pouvoir d'achat d'une grande majorité des couches sociales.

Lors de la conservation des pommes, les champignons sont les micro-organismes les plus fréquents capables de causer des dégâts. La principale maladie dans les entrepôts reste pour le moment la pourriture bleue causée par *P. expansum* et *P. verrucosum*. Elle est responsable de la plupart des pertes en chambres d'entreposage des pommes (Yahia, 2009). En outre, l'espèce *P. expansum* est qualifiée de nécrotrophe (« necros » qui signifie la mort et « trophique » qui veut dire nourriture ou prédation) pour sa capacité à envahir agressivement les tissus des fruits en tuant les cellules hôtes pour puiser ses nutriments (Vilanova *et al.*, 2014). Ce champignon pathogène est un parasite de blessures qui attaque particulièrement les fruits *pomaceae* (pommes, poires) aux épidermes altérés par les chocs ou les piqûres d'insectes et engendre une maladie poste-récolte désignée comme la pourriture bleue. Cette pourriture destructive se manifeste par des symptômes typiques qui sont souvent des lésions humides circulaires et concentriques avec un contour net et de couleur brun clair (Vilanova *et al.*, 2014). La zone du fruit atteinte est molle, aqueuse, présente une coloration allant du jaune au brun et se détache facilement du reste du fruit. Sur de vieilles lésions on peut observer le développement d'un mycélium blanc puis des spores vertes (Fig. 14).

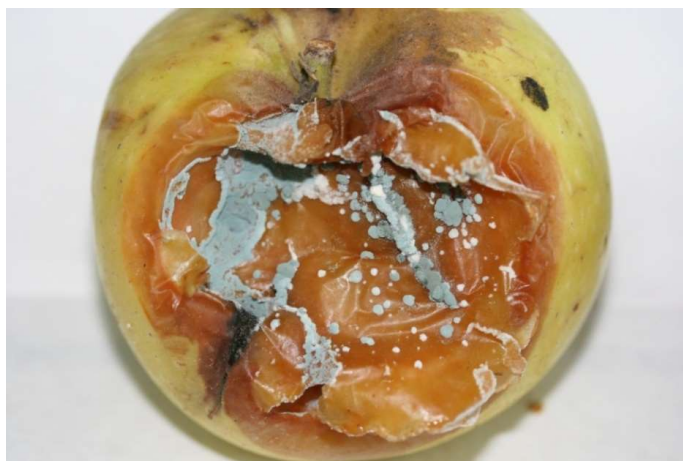


Figure 14. Symptômes de pourriture bleue causée par *Penicillium expansum* (INRA, 2016).

6. Les méthodes de lutte contre les pourritures des fruits

La prévention consiste d'abord à empêcher l'apparition des moisissures aux champs en recourant à de bonnes pratiques culturales (rotation des cultures, variétés adaptées). Les professionnels limitent le développement des moisissures au stockage par une bonne ventilation des stocks, un contrôle de la température, de l'humidité et de l'oxygénation dans les silos. Les pratiques culturales peuvent réduire la sévérité des maladies fongiques, mais d'autres moyens de lutte sont nécessaires. Les fongicides les plus utilisés appartiennent à la famille des benzimidazoles. L'usage de ces fongicides a engendré l'apparition de souches pathogènes résistantes. Par ailleurs, la plupart des pays importateurs de fruits, et plus particulièrement les pays européens ont adopté des législations très strictes vis-à-vis de l'emploi des pesticides. Ainsi, l'utilisation de certains produits est déjà limitée. La vinchlozoline ne peut plus être utilisée sur pommiers et poiriers que pendant la période de floraison pour combattre la pourriture de la mouche (*B. cinerea*). Le captane est interdit en Allemagne et en Hollande pour des problèmes d'éco-toxicologie. Dans d'autres pays européens la période entre la dernière application de cette matière active et la récolte a été allongée. Dans, un avenir proche, certains produits efficaces (benzimidazoles) ne seront plus autorisés.

6.1.1. Lutte chimique contre la pourriture à *Aspergillus* des raisins

A l'heure actuelle, la lutte contre la pourriture noire chez la vigne repose principalement sur l'utilisation de fongicides de synthèse spécifique. La lutte chimique vient en complément des mesures prophylactiques, qui consistent à diminuer l'attaque par le pathogène en créant des conditions défavorables au vignoble pour son développement, notamment en réduisant la

vigueur de la plante hôte (Valdes-Gomez *et al.*, 2008). Ainsi, toutes les opérations culturales suivantes freinent l'implantation et la propagation du champignon au sein des grappes : adaptation de la taille pour optimiser l'étalement de la végétation et des fruits, opérations en vert de dédoubleage, l'épamprage et l'effeuillage de la zone fructifère (Molitor *et al.*, 2011; Wilcox *et al.*, 2015).

D'une façon générale, la lutte chimique contre les champignons pathogènes est à l'origine de 79 % des traitements et au moins une application de fongicide est faite sur toutes les surfaces des bassins viticoles. Pendant les 35 dernières années, plusieurs molécules appartenant aux methyl benzimidazole carbammates (MBCs), dicarboximides, anilinopyrimidines (APs), hydroxyanilides, phenylpyrroles et plus récemment, succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs), ont été utilisées pour lutter contre *Aspergillus carbonarius* et *B. cinerea* (Fillinger *et Walker*, 2016; Hahn, 2014). La plupart des fongicides affecte des fonctions métaboliques essentielles chez le champignon telles que la respiration, l'osmorégulation, le fonctionnement des microtubules, la biosynthèse de méthionine et des stérols.

Le contrôle de la moisissure dans les raisins de table a été obtenu par application de dioxyde de soufre, soit par fumigation fréquente dans chambres de stockage, ou en emballant les raisins dans des boîtes en polyéthylène doublé avec des générateurs de SO₂ (Lichter *et al.*, 2002). Le SO₂ est généralement efficace pour prévenir la pourriture tant que les niveaux sont suffisamment hauts. Cependant, des niveaux élevés de SO₂ peuvent endommager les baies de raisin, avoir un arrière-goût désagréable et pourraient être nocifs pour l'homme (Zoffoli *et al.*, 2008). Actuellement, l'utilisation du SO₂ a été limité au stockage du raisin (Romanazzi *et al.*, 2007; Meng *et Tian*, 2009).

Cependant, l'apparition des effets secondaires de ces produits chimiques a remis en cause leur utilisation. En effet, l'apparition de souches résistantes aux différents produits chimiques ainsi que les problèmes de résidus dans les fruits et le vin compliquent considérablement leur utilisation et menacent leur efficacité (Leroux, 2004). La pression sélective exercée par l'application de fongicides contre ce pathogène a induit le développement des souches résistantes à ces fongicides (Leroux, 2004). Les phénomènes de résistance de ce pathogène, incluant la multirésistance à plusieurs familles chimiques vis-à-vis des différentes molécules utilisées dans les vignobles français ont été révisés par Walker *et al.* (2013). Ces phénomènes de résistance, la présence de résidus dans les produits finaux, l'image négative des produits chimiques dans la société, ainsi que la forte attente sociétale pour une viticulture respectueuse de l'environnement, mettent en cause l'utilisation de ces produits et justifient également la recherche de méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce pathogène.

6.1.2. Lutte chimique contre la moisissure bleue des pommes causée par *Penicillium*

La moisissure bleue causée par *Penicillium expansum* est la principale maladie à l'origine des pertes de fruits dans différentes zones de production (Blum *et al.*, 2007). Avant l'utilisation de chambres froides dotées d'une technologie à atmosphère contrôlée, ce champignon était responsable de 100% des pertes après récolte (Blum *et al.*, 2007). Même aujourd'hui, les fruits peuvent être endommagés, en particulier pendant une période de stockage prolongée (Fachinello *et al.*, 2012).

Afin de réduire les pertes après récolte, la désinfection des fruits est généralement effectuée à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium ou par des méthodes de lutte chimique comme l'utilisation d'acibenzolar-S-méthyle (ASM), d'éthanol ou de bicarbonate de sodium. Cependant, l'utilisation de fongicides, en plus de rendre la production plus coûteuse, peut entraîner une sélection d'isolats résistants aux principes actifs. En outre, en raison de l'inquiétude du public à l'égard des résidus chimiques de synthèse sur les aliments, il devient nécessaire de rechercher des mesures de remplacement pour lutter contre les phytopathogènes.

Selon l'agence de protection environnementale (EPA), ces pesticides posent un véritable problème de santé publique, et pas seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour la population générale. En effet, les effets de faibles quantités de pesticides, en mélange, pendant des périodes longues posent de nombreux problèmes de santé. L'épidémiologie nous montre ainsi que les personnes exposées aux pesticides ont plus de risque de développer de nombreuses maladies que les autres : cancers, malformations congénitales, problèmes d'infertilité, problèmes neurologiques ou encore système immunitaire affaibli. Face à cette menace, une seule solution : il faut évaluer d'avantage les pesticides dans le domaine de l'agriculture pour interdire *a priori* tous ceux qui présentent un potentiel toxique pour l'Homme (AGF, 2012).

Face au public, la lutte chimique a une image négative liée principalement aux phénomènes de pollution. D'une façon générale, au niveau sociétal et réglementaire, la tendance est défavorable à la lutte chimique. Pour cela, le Grenelle de l'environnement a fixé comme objectif de réduire de 50% d'ici 2025 les traitements avec les produits issus de la synthèse chimique. La recherche de moyens alternatifs est donc d'une urgente nécessité. Dans ce contexte la lutte biologique, ou biocontrôle, est en plein essor et elle constitue une voie possible pour minimiser les nuisances décrites ci-avant.

6.2. Lutte biologique

La lutte biologique se définit comme une méthode de lutte contre un ravageur, une maladie ou une plante adventice, en utilisant des agents naturels antagonistes de ceux-ci (bactéries, levure, champignons...). Elle a fait l'objet de nombreuses études afin de mettre au point des méthodes alternatives pour inhiber la décomposition fongique dans les fruits et les légumes (Meng *et* Tian, 2009). Les agents naturels utilisés sont réunis sous le concept de Biopesticides.

Certains, et notamment les auteurs anglo-saxons, en donnent une définition plus large, en y incluant toutes les substances organiques qui ont un effet protecteur sur les plantes, qu'elles soient trouvées dans la nature ou synthétisées chimiquement (extraits végétaux, hormones, phéromones...) (Nicot, 2011; Fillinger *et* Elad, 2016).

6.2.1. Agents de lutte biologique

6.2.1.1. Les substances naturelles

De nombreuses substances naturelles utilisées pour lutter contre les maladies de la vigne sont des stimulateurs de défense des plantes (SDP) contre des attaques fongiques comme le mildiou, l'oïdium et la pourriture noire. Parmi ces substances on peut citer : l'ergostérol, la limarine, les oligogalacturonides, le chitosane (Aziz *et al.*, 2006; Yakoub, 2015) et le benzothiadiazole (BTH) (Dufour *et al.*, 2013). Des extraits de fenugrec ont été aussi employés pour stimuler les défenses de la vigne contre l'oïdium. Les essais réalisés jusqu'à présent en conditions contrôlées au laboratoire sont prometteurs, mais les résultats obtenus sont souvent difficilement reproductibles sur le terrain. Certaines molécules naturelles telles que la cystéine ou le chitosane (Nascimento *et al.*, 2007; Yakoub, 2015) ont montré *in vitro* ou en serre, des potentialités de protection intéressantes contre certains champignons associés aux maladies du bois de la vigne.

6.2.1.2. Champignons et oomycètes

La protection biologique des plants de vigne ou des pommiers contre les champignons impliqués dans les pourritures des fruits peut se faire à l'aide d'agents microbiens provenant de la rhizosphère comme les *Trichoderma* spp., (Tuao Gava *et* Leal-Menezes, 2012). Les *Trichoderma* spp. sont des biofongicides efficaces sur plants de vigne vis-à-vis des pathogènes fongiques (Kotze *et al.*, 2011). En effet, ils inhibent les pathogènes fongiques via le processus de mycoparasitisme ou de compétition pour les nutriments et l'espace (Di Marco *et al.*, 2004; Fourie *et* Halleen, 2004, 2006; John *et al.*, 2005; Di Marco *et* Osti, 2007; Halleen *et al.*, 2010; Kotze *et al.*, 2011; Kovács *et al.*, 2014; Mounier *et al.*, 2014; Aloï *et al.*, 2015). Plusieurs souches de *Trichoderma* sont homologuées et commercialisées. C'est le cas du produit nommé

Biotricho® contenant une souche de *T. harzianum*, du Vinevax contenant trois souches de *T. harzianum* et trois souches de *T. atroviride* (Kotze et al., 2011). Le produit Esquive WP® a récemment été homologué en France contre l'esca et l'eutypiose (Mounier et al., 2014). D'autres micro-organismes aux propriétés antagonistes tels que *Pythium oligandrum* et *Fusarium lateritium* ont également été testés (Christen et al., 2005; Yacoub et al., 2016). En ce qui concerne *P. oligandrum*, c'est un oomycète naturellement présent dans la rhizosphère des ceps de vigne (Gerbore, 2013). Il peut exercer des effets directs sur les champignons pathogènes, ou encore des effets indirects en stimulant les systèmes de défense de la plante, ce qui leur permet de résister aux infections contre de nombreux agents pathogènes (Takenaka et al., 2006; Mohamed et al., 2007).

6.2.1.3. Les bactéries

Plusieurs bactéries ont été utilisées comme agent de biocontrôle contre les pathogènes fongiques (Compant et al., 2013; Rezgui et al., 2015; Haidar et al., 2016). Elles peuvent inhiber ou réduire la croissance des pathogènes impliqués dans les maladies du bois de la vigne.

Les espèces *Bacillus* and *Pseudomonas* sont connues pour leur implication dans l'élimination de champignons pathogènes de plantes (Renault et al., 2007).

De nombreuses souches de *Bacillus* (notamment *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. pumilus*) sont connus pour supprimer la croissance fongique *in vitro* en raison de la production d'antibiotiques antifongiques (Gong et al., 2015; Gonzalez Pereyra et al., 2018).

En effet, *Bacillus subtilis* peut inhiber la croissance de nombreux phytopathogènes (Chen et al., 2008; Leelasuphakul et al., 2008) tels que *A. ochraceus* et *A. carbonarius* (Senthil et al., 2011), *P. expansum* (Senthil et al., 2011), ainsi que d'autres espèces comme *B. cinerea*. Certains composés antagonistes produits par *B. subtilis* en culture liquide ont été signalés comme les principaux facteurs qui inhibent la croissance fongique et incluent les iturines, les bactériocines, les surfactants peptides lipidiques et les peptides antimicrobiens (Wu et al., 2005). En outre, les produits volatiles de *B. subtilis* inhibent la germination des spores et la croissance des hyphes de certains champignons pathogènes (Chen et al., 2008). De plus, Hashem et al. (2013) ont signalé que l'application de *B. subtilis* avant la récolte et le refroidissement post-récolte pourrait effectivement réduire les pertes et prolonger la durée de conservation du raisin de table.

6.3. Mécanismes d'action des bactéries impliquées dans la lutte biologique contre les champignons

Les bactéries agissent directement ou indirectement sur les pathogènes via plusieurs mécanismes de lutte biologique : l'antibiose, la compétition pour l'espace et les nutriments ou par la stimulation du système immunitaire de la plante hôte (Rezgui, 2015).

6.3.1. La compétition pour l'espace et les nutriments

La concurrence se produit lorsque les agents de biocontrôle et les agents pathogènes ont besoin des mêmes ressources. Une compétition efficace pour les nutriments disponibles et pour les niches représente un mécanisme important responsable de la protection bactérienne des plantes contre divers agents pathogènes (Lugtenberg et Kamilova, 2009; Haidar *et al.*, 2016). La suppression de l'infection des champignons pathogènes par compétition pour des niches et des nutriments s'est révélée efficace dans plusieurs études *in situ* et *in vivo*. En effets, les champignons sont très sensibles à la concurrence car des nutriments externes sont nécessaires à la germination des conidies, à la croissance du tube germinatif et à la réussite de l'infection (Elad et Stewart, 2004; Haidar *et al.*, 2016). En outre, il a été suggéré que ce mécanisme serait l'un des principaux mécanismes de contrôle des maladies post-récolte (Sharma *et al.*, 2009; Jamalizadeh *et al.*, 2011).

La capacité des bactéries antagonistes à coloniser rapidement les blessures des fruits, avant l'installation des champignons pathogènes, est une caractéristique importante des agents de lutte biologique post-récolte qui réduisent l'incidence et/ou la gravité de la pourriture grise dans les fruits (Sharma *et al.*, 2009; Jamalizadeh *et al.*, 2011; Haidar *et al.*, 2016). De même, la compétition des bactéries près des spores pour l'obtention d'éléments nutritifs peut entraîner une inhibition accrue de la germination des spores des pathogènes sur la surface des fruits. C'est également considéré comme un facteur critique pouvant limiter leur efficacité en matière de biocontrôle (Lugtenberg et Kamilova, 2009). Bien que la germination conidiale des moisissures dépende fortement de la disponibilité des éléments nutritifs, le processus d'infection subséquent peut également être perturbé par l'utilisation de bactéries antagonistes qui utilisent les éléments nutritifs disponibles plus efficacement que l'agent pathogène.

L'application de bactéries compétitives sur organes floraux, abritant des grains de pollen, des exsudats de stigmatisation et des pétales morts et/ou sénescents, prive les champignons d'importantes sources de nutriments. De plus, l'exclusion de pathogène d'un site d'infection par les bactéries colonisant rapidement cette région, pourrait constituer une méthode appropriée

pour protéger les tissus de l'hôte blessé, notamment les fruits blessés pendant la maturation et le stockage après récolte (Haidar *et al.*, 2016).

6.3.2. L'antibiose

L'antibiose est un mécanisme couramment admis dans l'activité de biocontrôle des bactéries à la surface des feuilles, dans la rhizosphère et dans les plaies des fruits (Ghaouth *et al.*, 2004). Selon Haidar *et al.* (2016) les antibiotiques englobent un groupe chimiquement hétérogène de composés organiques de bas poids moléculaire, produits par des micro-organismes qui sont nuisibles à la croissance ou aux activités métaboliques d'autres micro-organismes.

Les micro-organismes producteurs d'antibiotiques ont souvent été considérés comme le premier moyen de dépister les BCA (Biocontrol Agents), en utilisant des tests *in vitro* réalisés sur gélose et/ou en culture liquide. De nombreux rapports de la littérature soutiennent le potentiel important des bactéries qui produisent des métabolites antifongiques pour contrôler les *Aspergillus* et les *Penicillium* à la fois *in vitro* et sur un large éventail d'espèces de plantes hôtes. De nombreux programmes de recherche montrent que *Bacillus* est l'un des genres de bactéries le plus efficace pour lutter contre les maladies des plantes (Nagorska *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011 ; Haidar *et al.*, 2016).

Il est largement admis que les espèces *Bacillus* et *Paenibacillus* produisent diverses substances antifongiques, notamment des antibiotiques lipopeptidiques, des protéines antifongiques, des composés volatils, des enzymes lytiques, d'autres antibiotiques et des enzymes liées à la défense des plantes (Malfanova *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Haidar *et al.*, 2016). *Bacillus subtilis* est une espèce clé qui inhibe la croissance d'un large éventail de phytopathogènes en produisant une grande variété de métabolites antifongiques puissants, y compris les lipopeptides. Les lipopeptides cycliques appartiennent à trois grandes familles, à savoir la surfactine, l'iturine et la fengycine (ou plipastatine). La plupart des métabolites secondaires produits par *Bacillus spp.* sont des antibiotiques peptidiques (Haidar *et al.*, 2016).

6.3.3. Production d'enzymes lytiques et interférence avec l'activité et la croissance des agents pathogènes

Certaines souches bactériennes de biocontrôle produisent d'autres métabolites, tels que des enzymes qui peuvent interférer avec les activités métaboliques et/ou la croissance d'agents pathogènes (Compant *et al.*, 2005; Haidar *et al.*, 2016). Certaines enzymes peuvent dégrader ou désintoxiquer les facteurs de virulence des agents phytopathogènes. Par exemple, l'acide oxalique contribue à la virulence de *B. cinerea* (Haidar *et al.*, 2016).

La production d'enzymes lytiques extracellulaires est associée aux capacités de lutte biologique de certaines bactéries : les chitinases, les glucanases, les cellulases, les protéases, et les lipases qui dégradent les composants de la paroi cellulaire des champignons pathogènes, contribuent à la suppression directe des pathogènes de plantes (Neeraja *et al.*, 2010; Maksimov *et al.*, 2011; Bouizgarne, 2013).

Les bactéries halophiles telles que *Virgibacillus marismortui*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Terribacillus halophilus*, *Halomonas elongata*, *Lanococcus rifetoensis*, *Staphylococcus equorum* et *Staphylococcus sp.*, produisent *in vitro* des enzymes hydrolytiques antifongiques extracellulaires, notamment la chitinase, la β -1,3-glucanase, la cellulase et la protéase (Essghaier *et al.*, 2009).

6.3.4. Production de composés organiques volatils

Ces dernières années, les effets des composés organiques volatils (COV) bactériens sur les plantes et les agents pathogènes ont été de plus en plus étudiés (Ryu *et al.*, 2004; Eümert *et al.*, 2012; Haidar *et al.*, 2016). Les COV peuvent constituer l'un des mécanismes clés permettant de lutter efficacement contre les agents phytopathogènes (Ryu *et al.*, 2004; Eümert *et al.*, 2012). L'émission de mélanges complexes de COV par les bactéries a été rapportée dans de nombreuses études (Kai *et al.*, 2009; Eümert *et al.*, 2012). Les COV bactériens inhibent ou empêchent la croissance fongique, altèrent les spores et les hyphes fongiques et/ou favorisent la croissance des plantes (Kai *et al.*, 2009; Weisskopf, 2013). Cependant, les COV d'une souche bactérienne n'entraînent pas le même effet inhibiteur, ni le même effet négatif, sur différents champignons. Les réponses peuvent dépendre de la combinaison spécifique champignons/bactéries (Kai *et al.*, 2009).

La plupart des études concernant les effets des COV sur la pourriture grise ont été réalisées dans des conditions contrôlées. Par conséquent, leurs avantages et inconvénients pour les applications sur le terrain doivent être pris en compte. Les impacts des paramètres environnementaux, en particulier les mouvements d'air, peuvent être d'une importance majeure. Des courants d'air élevés pourraient réduire considérablement la concentration de COV produits et limiter leur efficacité. De plus, l'ajout d'éléments nutritifs dans le sol, tels que les sources de carbone, peut favoriser la production bactérienne de COV (Haidar *et al.*, 2016).

6.3.5. Induction de la résistance de la plante hôte

En plus de ces interactions directes, certaines bactéries qui favorisent la croissance des plantes sont indirectement efficaces contre les agents phytopathogènes en renforçant les mécanismes

de défense des plantes, qui constituent la résistance systémique induite (ISR). Cela correspond à un état de défense dans la plante entière, la préparant à réagir plus rapidement et plus intensément à une attaque d'agents pathogènes (Haidar *et al.*, 2016). Les ISR impliquent les voies de signalisation de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (Glick, 2012). L'induction de la résistance systémique chez la vigne à l'aide de micro-organismes bénéfiques a été examinée par Compant *et al.* (2013). Plusieurs composés produits par des bactéries, y compris les substances volatiles, les sidérophores, l'agelline et les lipopeptides ont un fort effet ISR contre les moisissures chez de nombreuses espèces végétales (Wu *et al.*, 2008 ; Haidar *et al.*, 2016).

Cependant, davantage de recherches doivent être menées pour mieux comprendre les effets des facteurs biotiques et abiotiques sur l'induction des plantes pour la santé, la croissance et la productivité des plantes.

Matériels et Méthodes

1. Les microorganismes pathogènes

1.1. Matériel végétal et échantillonnage

Pour les *Aspergillus*

Afin d'identifier et de caractériser les espèces d'*Aspergillus* ochratoxinogènes isolées à partir de raisins, une enquête a été réalisée dans les deux principales régions viticoles produisant du raisin de table dans le Nord de la Tunisie : Mornag et Zaghouan (annexe 1). Le choix des exploitations n'a concerné que des vignobles subissant une intensification de culture avec une conduite palissée, conditions favorables à l'installation des parasites au niveau de la charpente du cep.

Les échantillons ont été prélevés dans deux vignobles. Il convient de noter que la région de Mornag est la plus grande zone de production de raisins de table en treillis avec des superficies supérieures à 2000 ha. L'échantillonnage a été réalisé au stade fermeture de la grappe en juillet 2013. Les cultivars concernés étaient composés de vignes matures Muscat d'Italie et Red Globe, les deux variétés les plus cultivées en Tunisie. Dans chaque vignoble, une caisse remplie de raisins pourris a été collectée et transportée au laboratoire afin d'isoler les agents pathogènes responsables de la pourriture des raisins.

Pour les *Penicillium*

L'échantillonnage a été réalisé dans la région de Sbiba (gouvernorat de Kasserine) située dans le centre-ouest de la Tunisie (annexe 2) et qui occupe le premier rang pour la production de pommes, soit 47% de la production nationale.

L'échantillonnage a concerné les fruits d'aspect malade. Au total, 18 échantillons ont été prélevés et transportés au laboratoire. Les variétés concernées par l'échantillonnage sont Starkrimson et Golden delicious, qui représentent plus de 90% des variétés tardives les plus cultivées en Tunisie.

1.2. Isolement et identification morphologique des isolats du genre *Aspergillus*

Des morceaux de baies de quelques millimètres de long ont été coupés avec un sécateur, désinfectés dans une solution d'hypochlorite de sodium et séchés sur du papier filtre stérilisé. Ces morceaux ont ensuite été déposés sur de la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA) et incubés à température ambiante (25°C) pendant 10 jours. Lorsqu'un développement mycélien était observé, les colonies étaient transférées sur de la gélose à l'extrait de malt (MEA, pH = 5.6) et incubées à 25°C. Ce milieu a été utilisé pour la croissance et l'identification de

champignons ainsi que pour les tests chimiques et de contrôle effectués dans cette étude. Un total de 87 souches fongiques a été récupéré.

Dans la mesure du possible, l'identification taxonomique des champignons isolés a été basée sur des caractéristiques morphologiques, l'examen des structures fructifères et des conidies au microscope et de croissance (apparition et vitesse de croissance des colonies sur milieu PDA). Les déterminants standards définis par Brown (1987), Burgess *et al.* (1994), Ellis et Ellis (1997) et Kirk *et al.* (2008) ont été utilisés.

Pour la conservation des *Aspergillus*, les colonies riches en spores ont été écrasées dans des tubes contenant 1 ml d'eau physiologique par vortexage et 500 µl de ce mélange ont ensuite été transférés dans un cryotube contenant 500 µl de glycérol. 87 souches d'*Aspergillus* ont ainsi été mises en collection.

1.3. Isolement et caractérisation des isolats du genre *Penicillium*

Un total de 20 champignons pathogènes a été isolé à partir de la surface des pommes pourries par grattage et sont ensuite cultivés sur milieu Malt-Agar et incubés pendant une période de 7 jours à 25°C avant d'être identifiées sur la base de critères morphologiques (couleur et forme des colonies et aspect microscopique du mycélium et des spores) et moléculaires (séquençage ITS). La purification des isolats a été réalisée par la technique des cultures monospores obtenues par repiquage d'une spore suite à des dilutions successives d'une souche mère.

La conservation des isolats établis a été réalisée à partir de disques de mycélium de cultures pures âgées de 10 jours et mélangés à 1 ml d'eau physiologique préparée à partir de 20 ml de glycérol et 80 ml d'eau distillée stérile. Un total de 20 isolats de *Penicillium* ont ensuite été mis en collection.

1.4. Identification des champignons par séquençage partiel de la région ITS (ITS – 5.85 – ITS2)

1.4.1. Extraction de l'ADN génomique

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de mycéliums fongiques prélevés à la surface du milieu de culture par grattage, lyophilisés pendant une nuit, et broyés à l'aide d'un Tissu Lyser II (Qiagen). Un volume de 400 µl de tampon d'extraction CTAB (1X) chauffé à 65°C a été ajouté au broyat de chaque tube. Ces derniers ont été vortexés et placés dans un bain marie à 65°C pendant une heure. Ensuite un volume de 400µl de chloroforme:isoamylalcool (24 :1) a été ajouté et les tubes ont été agités par retournement à la main avant d'être centrifugés 30 minutes à 13000 rpm à 4°C. Un volume V de la phase aqueuse a été récupéré et transféré dans un nouveau tube ou 2/3 du volume V d'isopropanol froid ont été ajoutés. Les tubes ont été laissés à précipiter à -20°C pendant une nuit après avoir été agités manuellement par retournement pendant 10 minutes. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés pendant 30 minutes à 4°C, après avoir éliminé les surnageants, les culots ont été rincés avec 800 µl d'éthanol 70° et recentrifugés pendant 30 minutes à 13000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 50 µl d'eau distillée stérile.

Les ADN ainsi extraits ont ensuite été dosés pour chaque échantillon à l'aide d'un nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermoscientific, Labtech) et stockés à -20°C avant leur utilisation.

1.4.2. Amplification par PCR et séquençage des gènes ITS

Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf) dans un volume réactionnel de 30 µl contenant 2 µl d'ADN (50 ng/µl), 3 µl de tampon (10x), 2 µg de MgCl₂ (50Mm), 0.6µl de dNTP (10 mM), 0.6µl de chaque amorce à 10 µM, 3µl de BSA à 10 µg/µl (BioLabs), 0.1 de Taq polymérase et 18.1 µl d'eau distillée stérile.

Le programme suivant a été utilisé pour les ADN fongiques : dénaturation initiale de 2 min à 95°C suivie de 30 cycles de dénaturation 1 min à 95 °C), de fixation des amorces (1 min, 55°C), d'élongation (1 min à 72°C) et d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

Les produits de PCR ont été envoyés à Beckman Coulter Genomics (Takeley, Royaume-Uni) pour le séquençage partiel de la région ITS (ITS1 – 5.85 – ITS2) avec les amorces ITS1F et ITS4 (Tableau 3). Afin de confirmer l'identification des champignons potentiellement

pathogènes, un séquençage de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADNr a été réalisé. Pour l'identification au niveau des espèces, les séquences ont été comparées à la base de données GenBank en utilisant le programme Blastn (Altschul *et al.*, 1997). Les séquences ITS sont disponibles dans la base de données GenBank sous le numéro d'accèsion MH249060 à MH249061.

Tableau 3. Amorces utilisées pour le séquençage

	Gène	Amorce	Séquence 5'3'	Amplicon (pb)	T°C annealing
Champignons	ITS	ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	650	55°C
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Bactéries	ADNr 16S	799f	AACMGGATTAGATACCCKG	750	52°C
		1492r	GTTACCTTGTTACGACTT		
	rpoB	rpoBf	AACMGGATTAGATACCCKG	350	55°C
		rpoBr	GTTACCTTGTTACGACTT		

1.5. Etude du pouvoir toxigène chez *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp.

1.5.1. Criblage des isolats producteurs d'OTA

Pour tester la capacité de production d'OTA, 87 isolats d'*Aspergillus* et les 15 isolats de *Penicillium* ont été cultivés sur du milieu Czapek Yeast Agar (CYA) pendant 7 jours à 25°C. Ce milieu est optimum pour la production d'OTA par les moisissures (Bragulat *et al.*, 2001) ; celles-ci puisent en effet dans ce milieu tous les nutriments nécessaires à la synthèse des métabolites toxiques.

1.5.2. Extraction de l'OTA

Trois carottes du milieu colonisé par le champignon ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile (ø 8 mm) et déposés dans un tube Eppendorf contenant 1 ml de méthanol (qualité HPLC). La gélose a été écrasée et le mélange a été incubé pendant 1 heure à température ambiante. Après centrifugation durant 10 minutes à 13000 rpm (3 fois), le surnageant a été filtré à l'aide d'une seringue (1 ml) et d'un filtre de 0.45 µm résistant aux solvants et adapté pour les seringues. Le filtrat a été récupéré dans un flacon HPLC.

La quantité d'OTA en ppb par 100 gramme de milieux est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'OTA en ppb/ 100g de Milieux} = \frac{\text{Quantité d'OTA en ppb} \times 100}{\text{Masse Milieux}}$$

Avec : Masse Milieux = Masse Eppendorf – Masse Eppendorf vide

1.5.3. Identification du pouvoir toxigène de chaque souche fongique pure par HPLC

L'appareil HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (BIO-TEK, Milan, Italie) a permis une détection par fluorescence ($\lambda_{ex} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 466 \text{ nm}$). Le système était également équipé d'une pompe permettant d'obtenir des gradients de solvants. Un logiciel (Kroma 3000) permettait de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données. La colonne analytique utilisée était de type Uptisphère 5 μm C18 ODB (150 x 4.6 mm) avec une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm. La phase mobile était un mélange acétonitrile (B)/0,2 % acide acétique (A) à un débit de 1 ml/min et la température de la colonne était de 30°C. Les injections ont été effectuées avec un injecteur auto-sampler (BIO-TEK, Milan, Italie) et le volume d'injection était de 80 μl (El khoury et Atoui, 2010).

Cette méthode facile et rapide permet de préparer un grand nombre d'échantillons en peu de temps, ce qui évite leur dégradation entre le moment où ils sortent de l'étuve et le moment où ils sont traités. Dans un premier temps, 87 échantillons d'*Aspergillus* provenant de souches pures fongiques ont été analysés, dans un deuxième temps 15 souches de *Penicillium* ont été testées.

Pour cette identification, les souches ont été réparties en quatre lots (chaque espèce représente un lot). Pour chaque lot une gamme étalon a été établie afin d'identifier les pics correspondant à l'OTA et de déterminer sa quantité. Pour cette gamme étalon, des standards de 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ppm ont été utilisés (Fig. 15). Les valeurs données par les chromatogrammes des standards ainsi obtenus (Tableau 4) ont permis d'établir la courbe étalon (Fig. 16) sur laquelle on a pu déterminer les valeurs de l'OTA des souches analysées.

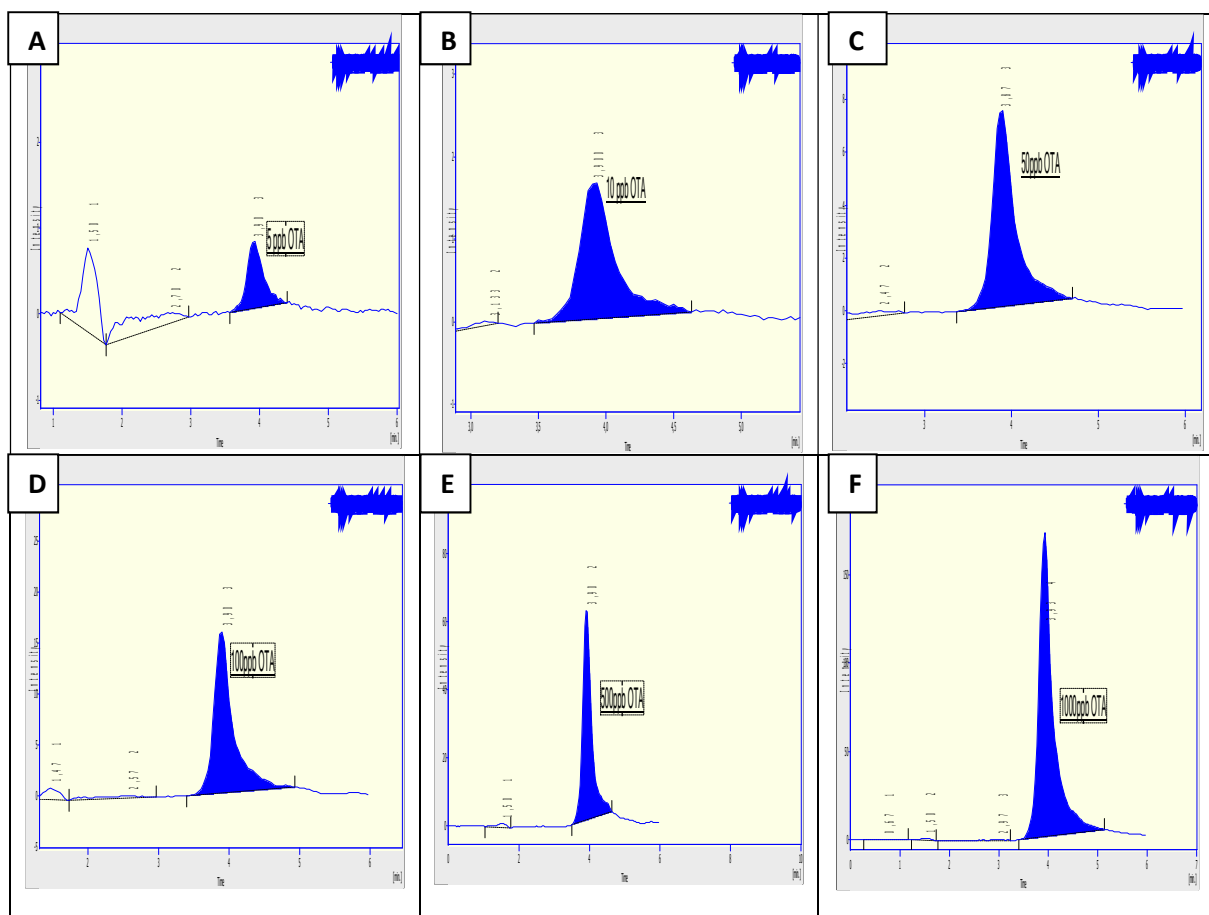


Figure 15. Chromatogramme des standards (A) 5, (B) 10, (D) 100, (E) 500, (F) 1000 ppm

Tableau 4 Quantités d'OTA en ppm

Quantité d'OTA en ppm	Aires [a.u.s]
5	13,288
10	31,195
50	140,505
100	308,347
500	1346,619
1000	3517,771

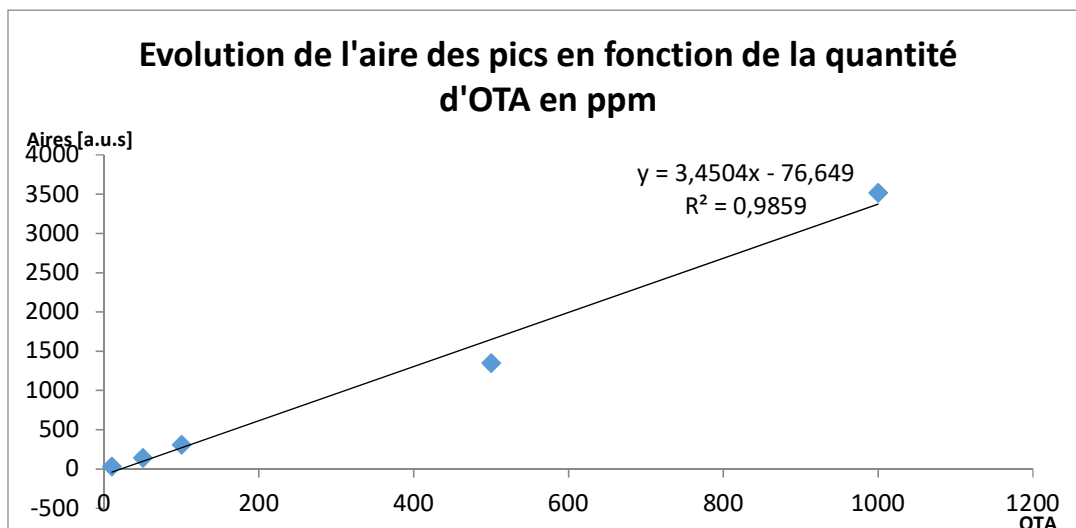


Figure 16. Courbe étalon utilisée pour déterminer la quantité d'OTA

2. Les bactéries antagonistes

2.1. Matériel végétal et échantillonnage

Afin d'étudier la microflore bactérienne habitant la rhizosphère de la vigne tunisienne, un échantillonnage a été réalisé durant l'été 2013 dans deux vignobles situés dans la région du Sahel située dans le centre-est de la Tunisie (une parcelle biologique, l'autre conventionnelle) (annexe 3). Ces vignobles étaient composés de vignes matures (10 ans) du cultivar de raisin de Table Rich Baba Sam, irriguées avec un système de goutte à goutte. Des échantillons de sol rhizosphérique (0-15 cm) ont été prélevés sur 10 points distants dans chaque parcelle : 20 échantillons au total ont été obtenus.

2.2. Isolement des bactéries de la rhizosphère du vignoble tunisien

Les rhizobactéries ont été isolées selon la technique de dilution en série consistant à mélanger 8 g de chacun des 20 échantillons de sol avec 50 ml d'une solution saline physiologique (NaCl à 0.85% dans de l'eau distillée). Les solutions ainsi obtenues ont été agitées pendant 15 minutes et filtrées avant d'être soumises à une série de dilutions (de 10^{-1} à 10^{-9}) et ensemencées sur du milieu de culture Luria-Bertani (LB, 5 g d'extrait de levure, 10 g de peptone, 10 g de NaCl et 15 g de gélose bactérienne). Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées 24 h à 25°C.

Après incubation, des colonies individualisées d'apparence différente ont été repiquées sur du milieu LB. Les isolats ainsi obtenus ont été purifiés par 3 repiquages successifs sur le même milieu. Un total de 109 souches bactériennes a été récupéré à partir des échantillons de sol

recueillis. Les 39 plus abondantes ont été sélectionnées sur la base de différences morphologiques, puis purifiées sur gélose LB et caractérisées.

2.3. Identification moléculaire des bactéries par séquençage des gènes ARNr 16S et *rpoB*

2.3.1. Extraction d'ADN des souches pures

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de culots bactériens obtenus par centrifugation à 3700 rpm pendant 30 min de cultures en milieu liquide TSB (Tryptone Soja Broth) âgées de 48h 400 µl de tampon d'extraction CTAB (1X) ont alors été ajoutés. Les tubes ont été ensuite incubés à 65°C pendant 1 heure. Après homogénéisation des échantillons, 400 µl de chloroforme:isoamylalcool (24:1) ont été ajoutés et les tubes agités par retournement avant d'être centrifugés pendant 10 min à 13 000 rpm. Un volume V de la phase aqueuse a été récupéré et 2/3 V d'isopropanol froid ont été ajoutés. Après avoir été mélangés par retournement, les tubes ont été laissés à -20°C pendant une nuit. Après une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été éliminé et les culots d'ADN lavés dans 700 µl d'éthanol froid. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été éliminé et les échantillons placés dans un Speed Vac (Jouan) pendant 20 minutes afin d'éliminer les dernières traces d'éthanol. Pour finir, les ADN bactériens ont été re-suspendus dans 50 µl d'eau distillée stérile.

Les ADN ainsi extraits ont ensuite été dosés pour chaque échantillon à l'aide d'un nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermoscientific, Labtech) et stockés à -20°C avant leur utilisation.

2.3.2. Amplification et séquençage

L'amplification des ADN bactériens a été effectuée en utilisant respectivement les amorces universelles 799f/1429r (ADNr 16S) et *rpoBf/rpoBr* (gène codant pour la sous-unité beta de l'ARN polymérase bactérienne) (Tableau 5).

Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 30 µl contenant 2 µl d'ADN (20 ng/µl), 3 µl de tampon (10x), 1 µl de MgCl₂ (50mM), 0.6 µl de dNTP (10 mM), 0.6 µl de chaque amorce (20 µM), 3 µl de BSA (10 µg/µl, BioLabs), 0.1 µl de Taq polymérase (SilverStar DNA polymerase, Eurogentec) et 19.1 µl d'eau distillée stérile.

En fonction du couple d'amorces utilisé, les deux programmes suivants ont été utilisés :

- une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C suivie de 25 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, de fixation des amorces à 54°C pendant 30 secondes et d'élongation à

72°C pendant 1 minute ; et une élongation finale de 10 min à 72°C pour le jeu d'amorces 799f/1429r.

- une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, de fixation des amorces à 55°C pendant 45 secondes, d'élongation à 72°C pendant 1 minute, et une élongation finale de 10 min à 72°C pour le jeu d'amorces *rpoBr/rpoBf*. Après vérification sur gel d'agarose (2% - 120V - 30 min de migration), les produits d'amplification ont été envoyés pour le séquençage chez Beckman Coulter Genomics (Takeley, Royaume Uni). Chaque séquence obtenue a été comparée à la base de données nucléotidiques du NCBI grâce au BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), et en fonction du pourcentage d'identité (>99% pour les bactéries), les noms d'espèces ont été assignés.

Tableau 5. Amorces utilisées pour le séquençage

Gène	Amorce	Séquence 5'3'	Amplicon (pb)	T°C annealing	
Bactéries	ADNr 16S	799f	AACMGGATTAGATACCCCKG	750	52°C
		1492r	GTTACCTTGTTACGACTT		
	<i>rpoB</i>	<i>rpoBf</i>	AACMGGATTAGATACCCCKG	350	55°C
		<i>rpoBr</i>	GTTACCTTGTTACGACTT		

2.4. Dépistage des caractères antagonistes favorisant la croissance des plantes (PGP)

2.4.1. Détection des gènes codant pour deux familles d'antibiotiques

Les 39 souches sélectionnées ont été criblées pour la production d'antibiotiques de type lipopeptides (LP) antifongiques appartenant à la famille des fengycines et de l'iturine en utilisant des amorces spécifiques. Quatre gènes codant les 4 fengycines (A, B, D et E) et d'une iturine (la bacillomycine) ont été recherchés (Lin et *al.*, 1998; Ramarathnam et *al.*, 2007; Alvarez et *al.*, 2011).

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf), dans un volume réactionnel de 30 µl constitué de 3 µl de tampon (10X), 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.6 µl de dNTP (10 mM), 0.6 µl de chaque amorce (Tableau 6), 3 µl de BSA (10 µg/µl) (New England BioLabs), 0.1 µl de Taq polymérase (Silver Star, Eurogentec), 19.1 µl d'eau distillée stérile et 2 µl d'ADN (20 ng/µl).

Tableau 6. Amorces spécifiques pour la recherche des gènes codant pour les fengycines A, B, D et E, et la bacillomycine chez les souches bactériennes

Gènes	Amorces	Sequence 5'3'	Amplicon (pb)	T°C annealing
Fengycine	FENAf	GACAGTGCTGCCTGATGAAA	900	54°C
	FENAr	GTCGGTGCATGAAATGTACG		
	FENBf	ATCCATGGTTAAAAACCAAAT	950	54°C
	FENBr	ACGGATCCATGCTATTTGGCAGC		
	FENDf	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT	950	53°C
	FENDr	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC		
	FENEf	GCCAAAAGAAACGAGCAG	950	53°C
	FENEr	GTCGGAGCTAACGCTGAAAC		
Bacillomycine	BACCF	GAAGGACACGGCAGAGAGT	900	60°C
	BACCr	CGCTGATGACTGTTTCATGC		

Pour les fengycines, le programme utilisé débute avec une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 45 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, d'hybridation des amorces à 53°C/54°C (Tableau 6) pendant 1 minute et d'élongation à 72°C pendant 2 minutes 30 secondes; et une élongation finale à 72°C pendant 8 minutes.

Pour la bacillomycine, le programme a consisté en une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, d'hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes et d'élongation à 72°C pendant 1 minute 45 secondes ; et une élongation finale à 72°C pendant 8 minutes.

Les produits de PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel de TBE à 2%.

2.4.2. Production de sidérophores

Les souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à produire des sidérophores en les cultivant sur milieu gélosé chromazurol S (CAS) [2.5% bouillon nutritif (NB, Conda), 1.5% agar, 0.1 M piperazine-1,4-bisethanesulfonique acide (PIPES), 10 µM Chrome Azurol S (Sigma) et 0.2 mM hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA, Sigma)] décrit par

Schwyn et Neilands (1987), et qui est basé sur l'affinité des sidérophores pour le fer. Le complexe ternaire chromazurol-fer-HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) sert d'indicateur coloré, lorsque le Fe^{3+} a été éliminé de ce complexe par des sidérophores bactériens à haute affinité, la couleur du milieu passe de bleue à orange. Ce test permet une visualisation très rapide des micro-organismes producteurs de sidérophores, un halo de décoloration apparaissant autour des colonies. L'inoculation des bactéries a été effectuée par piqûre centrale des géloses en boîte de Petri. Les expérimentations ont été réalisées en triplicat.

La production de sidérophores a ensuite été mesurée après une semaine d'incubation sur la base de la taille des halos orange (ds) formés autour des colonies. Les souches ont été désignées sid^+ , sid^{++} et sid^{+++} , respectivement lorsque $0 \text{ mm} < \text{ds} \leq 5 \text{ mm}$, $5 < \text{ds} \leq 10 \text{ mm}$ et $\text{ds} > 10 \text{ mm}$. L'expérience a été répétée trois fois.

2.4.3. Solubilisation du phosphate

Les 39 souches bactériennes ont été testées pour déterminer leur capacité à solubiliser les phosphates sur le milieu de Pikovskaya (PVK) [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/l; extrait de levure, 0.5 g/l; phosphate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 5 g/l; KCl, 0.2 g/l; Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.1 g/l; glucose, 10 g/l; Agar, 15 g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g/l; pH = 7].

Des pastilles bactériennes (5 mm de diamètre) provenant de cultures bactériennes fraîches ont été placées au centre des boîtes de gélose PVK et incubées à 28°C. Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque souche bactérienne. La zone de solubilisation a été déterminée 10 et 15 jours après l'inoculation en soustrayant le diamètre de la colonie bactérienne du diamètre de la zone totale (dp). Les souches ont été notées phos^+ , phos^{++} et phos^{+++} respectivement lorsque $5 \text{ mm} < \text{dp} \leq 15 \text{ mm}$, $15 \text{ mm} < \text{dp} \leq 30 \text{ mm}$ et $\text{dp} > 30 \text{ mm}$ (Rezgui *et al.*, 2016).

2.5. Caractérisation métabolique des rhizobactéries par des plaques Biolog EcoPlate™

2.5.1. Comptage des populations bactériennes par épifluorescence

Cette méthode de comptage précise pour les bactéries a été importée dans le laboratoire (UMR SAVE) grâce à l'aide du laboratoire de microbiologie du vin de l'ISVV Bordeaux qui en est vivement remercié.

La suspension bactérienne à analyser a d'abord été diluée à environ 10^6 CFU/ml. Si la concentration est plus faible, le comptage peut quand même être effectué en adaptant les calculs. 100 μl de cette suspension ont été filtrés sur une membrane noire de diamètre de pore 0.4 μm . La membrane a ensuite été imbibée avec 500 μl de tampon de réaction (Chemsol B16,

Biomérieux) et 2.5 µl de fluorochrome [ChemChrome V6 Acétate de fluorescéine (colore en vert uniquement les cellules vivantes), Biomérieux] puis incubée 45 minutes à 27°C pour être observée entre lame et lamelle avec un microscope à fluorescence (x1250 : objectif x100 sous bain d'huile à immersion) (Fig. 17). Des calculs basés sur le rapport entre la taille du champ observé et la taille de la membrane (x15622 : nombre de champs sur la membrane à travers l'objectif x100), ont alors permis d'obtenir la population de bactérie dans la suspension initiale.

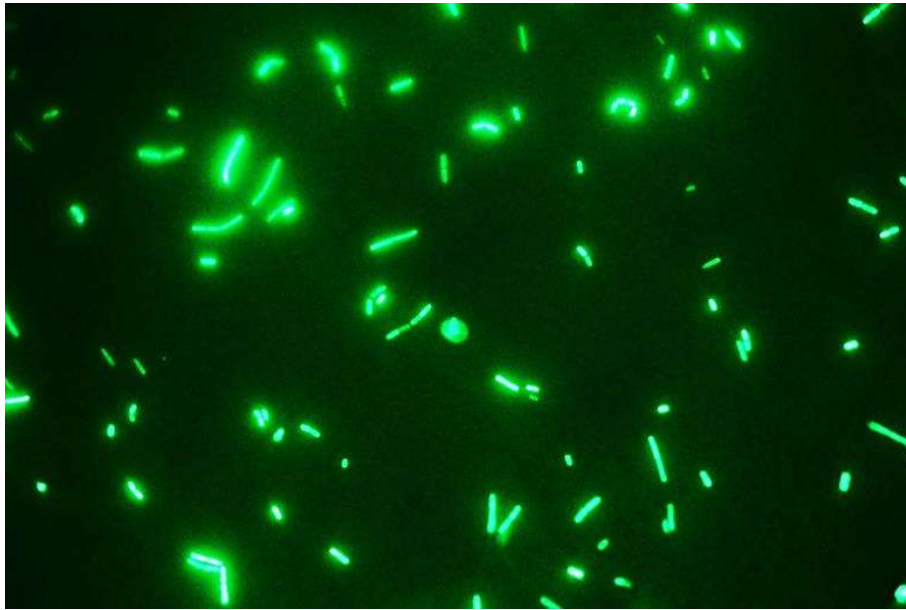


Figure 17. Photographie d'un champ de comptage d'épifluorescence de la souche S23 (grossissement x1250).

Cette méthode permet d'obtenir un résultat immédiat, afin d'évaluer précisément la population bactérienne d'une suspension à un moment donné. Cependant, elle est délicate dans sa mise en œuvre : seules sont comptées les bactéries vivantes dont la morphologie et les modes d'agrégation sont observables. Le résultat est donc exprimé en cellules viables/ml.

2.5.2. Identification des sources nutritives métabolisables : Biolog EcoPlate™

Après quantification par épifluorescence, les souches bactériennes en suspension ont été réparties dans des microplaques Biolog EcoPlate™ à 96 puits (AWEL International) (150 µl/puits) à une concentration de 10^6 UFC/ml. Ces plaques à 96 puits contenaient 31 sources de carbone différentes et un puits de contrôle en triplicat : 10 substrats contiennent du carbone et de l'azote (dont 6 amino-acides), 2 contiennent du carbone et du phosphore, et 19 ne contiennent que du carbone. Chaque puits contient, en plus du substrat, des sels de tétrazolium qui virent au violet lorsqu'ils sont réduits par l'activité bactérienne (Insam et Goberna, 2004) (Fig. 18). Les plaques ont été incubées à 26°C dans l'obscurité. L'absorbance ou densité optique (DO) a été

mesurée à une longueur d'onde de 590 nm avec un lecteur de microplaques (lecteur de microplaques Multimo, Synergy HT, Biotek) après 1h30, 24h, 48h et 5 jours d'incubation. Pour minimiser l'effet de la différence de densité entre les plaques, les données ont été normalisées comme suit : le développement moyen de la couleur des puits (ACWD) a été calculé pour chaque plaque ; ensuite, la valeur d'absorbance masquée de chaque puits a été divisée par l'ACWD de la plaque correspondante pour obtenir une valeur de DO corrigée (Garland et Mills, 1991). Toutes les valeurs OD corrigées ont été définies pour se situer entre 0 et 2, puis ont été utilisées pour des Analyses en Composantes Principales (ACP) avec le logiciel R (version 3.1.3.).

A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ -Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ -Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ -Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α -Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α -Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α -Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figure 18. Sources de carbone contenues dans une plaque Biolog EcoPlate™

3. Antagonisme *in vitro* contre les champignons ochratoxigéniques, *Aspergillus spp.* et *P. verrucosum*

3.1. Confrontations directes

L'activité antagoniste des isolats bactériens a été testée contre des souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, 2 genres fongiques ochratoxigéniques fréquemment trouvés sur vigne et pommes, en utilisant la technique des confrontations directes décrite par Déniel *et al.* (2004). Les 21 souches bactériennes ont été striées sur les bords des boîtes de Petri contenant de la gélose à la pomme de terre et au dextrose (PDA, Biokar diagnostics, France) et, après 48 heures d'incubation à 27°C, un plug mycélien de 6 mm de chaque champignon pathogène a été placé au centre de chaque boîte. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 27°C pendant 5 jours.

Toutes les expériences ont été effectuées en triplicat et répétées trois fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance a été calculé à l'aide de la formule : $I (\%) = 100 \times [(R2 - R1)/R1]$ avec R1: le rayon le plus long du mycélium fongique en direction de l'antagoniste (valeur témoin) ; R2 : la distance relative à la croissance du mycélium fongique (mm) en absence de l'antagoniste (Whipps, 1987).

3.2. Substances bactériennes volatiles

Les 21 rhizobactéries ont été testées pour leur capacité à produire des substances volatiles inhibant la croissance fongique en utilisant la technique de la double plaque. Deux souches d'*Aspergillus* et une souche de *Penicillium* ont été cultivées sur du milieu Malt Extract Agar (MEA) pendant 7 jours à 27°C dans l'obscurité, de sorte que les colonies atteignent une taille suffisante de 3.1 cm de rayon en moyenne avant d'être inversées sur des demi-boîtes de milieu trypto-caséine soja (TSA, Conda) striées avec les souches bactériennes à tester et scellées avec du Parafilm (Fig. 19). Cette disposition a permis aux boîtes de Petri inoculées avec les souches fongiques pathogènes de ne pas être contaminées par les bactéries susceptibles de tomber. Les plaques ont été incubées à 27°C dans l'obscurité. Dix répétitions ont été effectuées pour chaque souche bactérienne et l'expérience a été répétée trois fois. La croissance fongique a été mesurée après 5 et 7 jours d'incubation par rapport au témoin. Sur les plaques de contrôle, seules les souches fongiques poussaient.

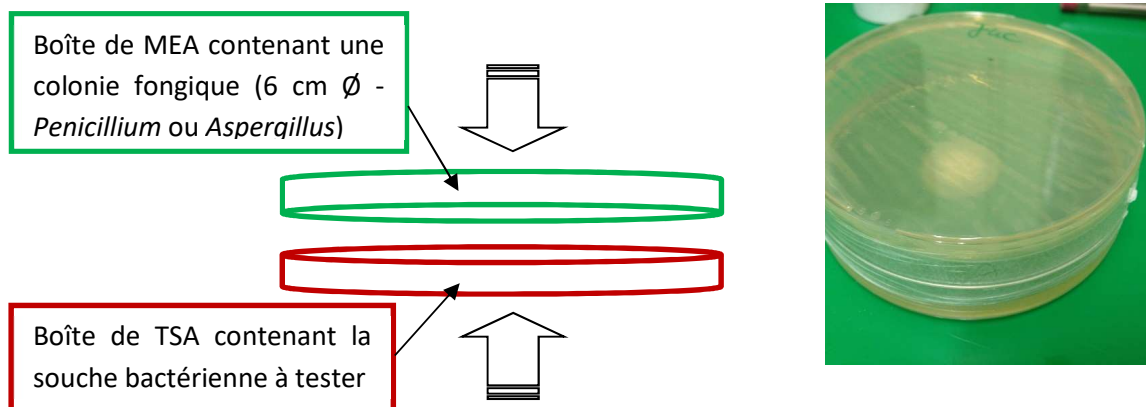


Figure 19. Schéma et photographie du dispositif de mise en co-culture

3.3. Essais biologiques *in vitro* sur baies de raisin avec *Aspergillus ochraceus* et *A. carbonarius*

Pour les essais biologiques *in vitro* sur la pourriture des baies des raisins, des raisins de table (cultivar: Thompson Seedless) provenant du supermarché ont été lavés pendant 15 min sous un

écoulement continu d'eau du robinet. Ensuite, ils ont été désinfectés en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (50 g/l ; pH 7.2) pendant 10 min, rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile, puis laissés à sécher à température ambiante. Les baies de raisins non endommagées ont été sélectionnées visuellement et soigneusement coupées des grappes à l'aide de ciseaux, avec le pédicelle attaché.

L'efficacité des bactéries contre *A. ochraceus* et *A. carbonarius* a été testée sur des baies blessées et non blessées. Le plan expérimental comprenait 20 baies par traitement (souche x agent pathogène x blessé – non blessé). Les baies non blessées ont été trempées dans des suspensions bactériennes (milieu LB). Pour les baies blessées, trois plaies artificielles (diamètre de 1–1.5 mm) ont été réalisées en utilisant un embout de pipette stérile. Ensuite, 10 µl de chaque suspension de souche bactérienne ont été introduits dans chaque site de plaie.

L'inoculation des baies blessées et non blessées avec les contrôles et témoins, consistaient en : (i) UUC (témoin non traité) non traité avec la bactérie et non inoculé avec l'agent pathogène, (ii) UC (contrôle non traité) inoculé avec des plugs de mycélium de l'agent pathogène, (iii) MC (témoin moyen) témoin non traité et non inoculé, pulvérisé uniquement avec un milieu de culture bactérien stérile LB, (iv) FC (lutte contre les fongicides) pulvérisé à l'aide d'un EcoSpray (A 520) avec une solution fongicide de Fluazinam (Sekoya, Syngenta France SAS, 50% ma, 250 g ma/100 l) (Haidar *et al.*, 2016).

Afin de permettre aux bactéries de mieux coloniser les baies avant l'inoculation de l'agent pathogène, 20 baies ont été placées sur une grille métallique dans des boîtes en plastique (19 x 13 x 4 cm) remplies de 100 ml d'eau distillée stérile et placées dans un incubateur à croissance contrôlée (Convion CMP-5090; Winnipeg, Manitoba, Canada) à 28°C dans le noir pendant 24 h. Après incubation, le centre de chaque fruit blessé et non blessé a été inoculé avec un plug mycélien (4 mm de diamètre) de *A. ochraceus* ou *A. carbonarius*, la face mycélienne faisant face à la surface de la baie. Les boîtes humidifiées pour *A. ochraceus* et *A. carbonarius* ont ensuite été replacées dans les chambres de croissance à 28°C. La sévérité de la pourriture d'*A. carbonarius* et d'*A. ochraceus* a été évaluée 8 jours post-inoculation. Pour chaque baie, le pourcentage de pourriture à la surface des baies blessées et non blessées a été évalué visuellement et la gravité moyenne de la pourriture de chaque traitement a été calculée comme décrit par Haidar *et al.* (2016).

3.4. Etude de l'activité antagoniste des bactéries sur les pommes

L'activité antagoniste des 21 souches bactériennes sélectionnées dans les tests de dépistage des critères antagonistes (PGP) et métaboliques (plaque Biolog Ecoplate), a été testée sur pommes blessées (Golden Delicious). Toutes les pommes étaient de même maturité et taille. Les pommes ont été stérilisées par immersion pour 2 min dans de l'hypochlorure de sodium à 1%, rincées à l'eau distillée stérile, et séchées dans des conditions d'asepsie. Les pommes ont par la suite été perforées avec un emporte-pièce stérile au niveau de la région équatoriale (3 mm de large x 3 mm de profondeur - une lésion par fruit). Les traitements ont consisté à inoculer 30 ml de 10^6 spores/ml de moisissures pathogènes, suivies de l'ajout de 30 ml de 10^8 cellules/ml de bactéries sélectionnées. Pour les témoins, seules les bactéries ou les spores fongiques ont été inoculées. Trois pommes par bactérie ont été utilisées.

Ensuite les pommes ont été placées sur du papier filtre humide, dans des boîtes en plastique stériles et macroperforées (huit trous \varnothing 1/4 9 mm). Ces boîtes ont été maintenues à 26°C pendant huit jours à une humidité relative de 95%. La lecture des résultats a été réalisée 8 jours après incubation dans une température constante de 26°C. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'infection et pourcentage d'inhibition des lésions. Le test a été répété deux fois.

Résultats et Discussion

Chapitre I

Caractérisation des pathogènes fongiques ochratoxinogènes

1. Introduction

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine classée comme cancérigène possible pour l'homme (groupe 2B) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1993). Elle est produite par plusieurs espèces de champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Les principales maladies causées par ces deux genres fongiques sont les pourritures noires des raisins et les pourritures bleues des pommes. En effet, les souches d'*Aspergillus* de la Section *Nigri* ont été impliquées dans la contamination par l'OTA des raisins et du vin (Bellí *et al.*, 2004; Chiotta *et al.*, 2009; Ponsone *et al.*, 2007; El Khoury *et al.*, 2010). La présence de l'OTA dans la filière raisin constitue donc un sérieux problème à la fois économique et sanitaire surtout dans les pays du bassin Méditerranéen, pays dans lesquels de hauts niveaux de contamination ont été rapportés (Castellari *et al.*, 2000; Markaki *et al.*, 2001; Cabanes *et al.*, 2002; Stefanaki *et al.*, 2003; Shephard *et al.*, 2003; Bejaoui *et al.*, 2006; El Khoury et Atoui, 2010). En outre, la contamination des pommes par l'OTA est peu élucidée, vu le manque de donnée sur ce sujet.

La première partie de ce chapitre est consacrée à (i) l'isolement et l'identification des principaux agents pathogènes impliqué dans la pourriture de raisins, (ii) l'étude du pouvoir de sécrétion des ochratoxines A par les *Aspergillus* afin de sélectionner des souches productrices.

La deuxième partie est réservée à (i) l'isolement et la caractérisation moléculaire des espèces de *Penicillium* responsables de la pourriture bleue chez les pommes et (ii) la sélection de souches de *Penicillium* ochratoxinogènes.

2. Résultats

2.1. Sélection des *Aspergillus* responsables de la pourriture de raisins

2.1.1. Isolement et identification macroscopique et microscopique

Dans cet essai, 87 souches fongiques ont été isolées à partir de baies de raisins, nommées ASP1 à ASP87 (Tableau 7). Après culture des différentes souches sur milieu MEA (incubation pendant 5 jours à 25°C) et en se basant sur des critères macroscopiques, nous avons classé nos souches en quatre espèces différentes appartenant toutes au même genre : *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. flavus* et *A. ochraceus* dont le nombre variait d'une région à une autre.

Tableau 7. Origine et identification moléculaire des souches fongiques isolées à partir des raisins. (ASP31 et ASP73 sont les souches sélectionnées pour les essais *in vivo* et *in vitro*).

Souches	Site d'échantillonnage	Variété	Identification moléculaire ITS (%identité GenBank)
ASP1	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 99%)
ASP2	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 98%)
ASP3	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP4	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 99%)
ASP5	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 100%)
ASP6	Mornag	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 98%)
ASP7	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1,, 99%)
ASP8	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1,, 99%)
ASP9	Zaghouden	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 98%)
ASP10	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 99%)
ASP11	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 99%)
ASP12	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP13	Mornag	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ178141.1, 98%)
ASP14	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP 15	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 98%)
ASP16	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 100%)
ASP17	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 98%)
ASP18	Zaghouden	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ178141.1, 98%)
ASP19	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 100%)
ASP20	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. ochraceus</i> (MK351278.1, 99%)
ASP21	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 99%)
ASP22	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (DQ178141.1, 98%)
ASP23	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP24	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 98%)
ASP25	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP26	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP27	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP28	Mornag	Red Globe	<i>A. niger</i> (D63375.1, 98%)
ASP29	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 98%)
ASP30	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 100%)
ASP31	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (100%) MH249061.1
ASP32	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP33	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. ochraceus</i> (MK351278.1, 99%)
ASP34	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 99%)
ASP35	Zaghouden	Red Globe	<i>A. ochraceus</i> (KX463003.1, 98%)
ASP36	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)
ASP37	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. flavus</i> (XM_002380655.1, 98%)
ASP38	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP39	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (D63375.1, 98%)
ASP40	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP41	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 98%)
ASP42	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 99%)
ASP43	Zaghouden	Red Globe	<i>A. flavus</i> (XM_002380655.1, 98%)
ASP44	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 98%)
ASP45	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 98%)
ASP46	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP47	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)

ASP48	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 100%)
ASP49	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP50	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. flavus</i> (KP725058.1, 99%)
ASP51	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. flavus</i> (KP725058.1, 98%)
ASP52	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (D63375.1, 99%)
ASP53	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)
ASP54	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP55	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP56	Mornag	Red Globe	<i>A. niger</i> (D63375.1, 100%)
ASP57	Mornag	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ178141.1, 99%)
ASP58	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 100%)
ASP59	Mornag	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ178141.1, 98%)
ASP60	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)
ASP61	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP62	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. flavus</i> (KP725058.1, 98%)
ASP63	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP64	Zaghouden	Red Globe	<i>A. ochraceus</i> (KX463003.1, 99%)
ASP65	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (DQ178141.1, 98%)
ASP66	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. flavus</i> (XM_002380655.1, 99%)
ASP67	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)
ASP68	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP69	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP70	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP71	Zaghouden	Red Globe	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 98%)
ASP72	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH868001.1, 98%)
ASP73	Zaghouden	Red Globe	<i>A. ochraceus</i> (98%)MH249060.1
ASP74	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (EF661204.1, 99%)
ASP75	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 98%)
ASP76	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP77	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 98%)
ASP78	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP79	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. ochraceus</i> (MK351278.1, 99%)
ASP80	Zaghouden	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (DQ207726.1, 98%)
ASP81	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)
ASP82	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 99%)
ASP83	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 98%)
ASP84	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 99%)
ASP85	Mornag	Muscat d'Italie	<i>A. niger</i> (D63375.1, 98%)
ASP86	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH870107.1, 98%)
ASP87	Zaghouden	Red Globe	<i>A. carbonarius</i> (MH249061.1, 98%)

Les souches isolées étaient de différents aspects et couleurs et avaient des vitesses de croissance différentes. L'observation macroscopique a été effectuée après incubation de ces 4 groupes fongiques pendant 3 et 7 jours à 25°C sur milieu MEA :

-*Aspergillus flavus* : Colonies de couleur verdâtre à l'aspect poudreux très distinctif morphologiquement (Fig. 20 A).

-*Aspergillus ochraceus* : Colonies de couleur jaune ocre, avec apparition de zones concentriques dues à la production en alternance de têtes conidiennes et de sclérotés. Cette

espèce (*A. ochraceus*) présente des caractéristiques spécifiques qui permettent de la distinguer macroscopiquement des autres colonies d'*Aspergillus* (Fig. 20 B).

-*Aspergillus carbonarius* : Colonies de couleur noir grisâtre à l'aspect velouté. *A. carbonarius* se distingue facilement des autres *Aspergillus* noirs par ses larges conidies verruqueuses (Fig. 20 C).

-*Aspergillus niger* : Colonies chargées de spores de couleur noir se présentent sous forme duveteuse. Il est possible de le confondre avec *A. carbonarius*. Les caractéristiques macroscopiques des deux espèces se chevauchent, ce qui ne permet pas de les différencier de manière fiable sur la seule base des caractéristiques morphologiques de la colonie. Les souches indéfinies sont nommées « *black Aspergillus* » (Fig. 20 D).

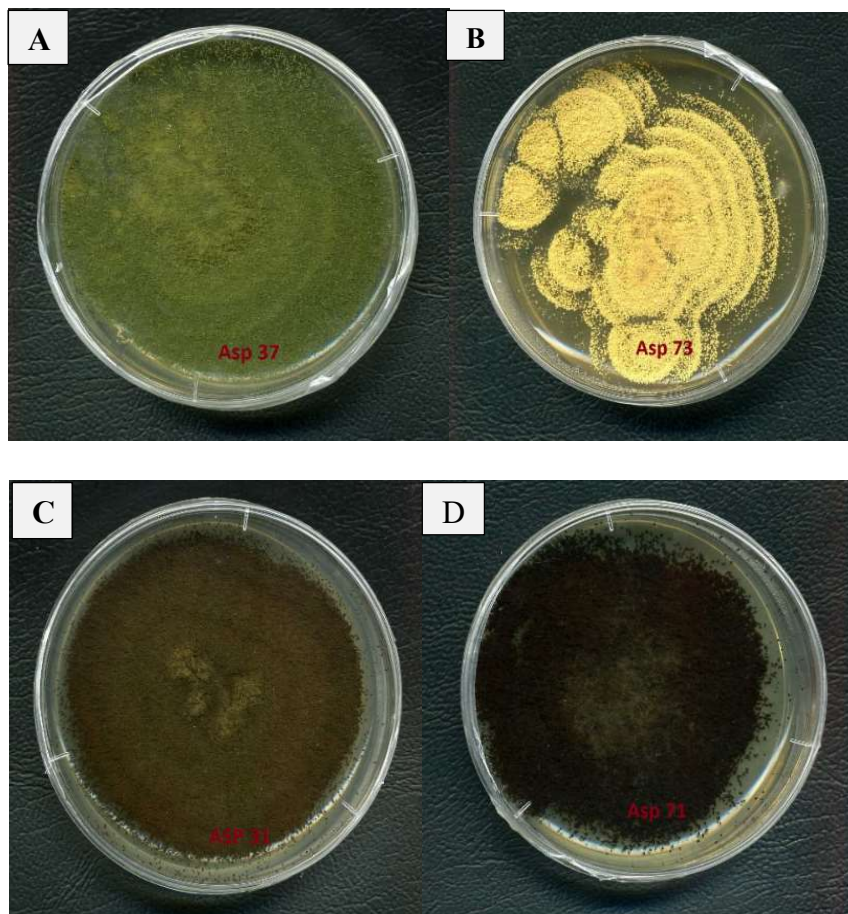


Figure 20. Aspect macroscopique des souches d'*Aspergillus flavus* (A), *A. ochraceus* (B), *A. carbonarius* (C), et *A. niger* (D) après 7 jours d'incubation à 25°C sur milieu MEA.

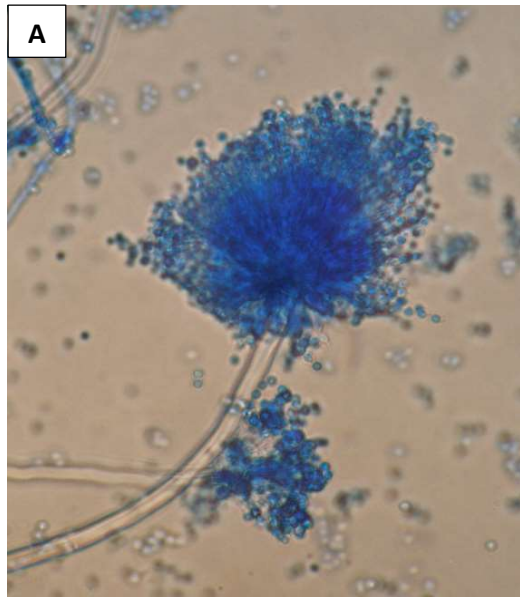


Figure 21. Aspects microscopiques de conidiophores d'*Aspergillus* observés au microscope optique (objectif x320). *Aspergillus flavus* (A), *A. ochraceus* (B), *A. carbonarius* (C), et *A. niger* (D).

L'examen microscopique confirme le genre : les conidiophores sont longs (jusqu'à 1500 μ m de longueur) et les plus âgés sont rugueux. Chaque conidiophore se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule globuleuse, à partir de celle-ci se forment des phialides. Les phialides forment des conidies unicellulaires, basipétales disposées en chaînettes et qui mesurent 3 à 6 μ m de diamètre. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique (25 à 60 μ m de diamètre). Ces têtes sont uni ou bisériées, selon leur degré de maturation radiées. (Fig.21).

En se basant sur les critères micro- et macroscopiques des isolats fongiques (87 souches d'*Aspergillus*), nous avons pu identifier quatre groupes d'espèces d'*Aspergillus* :

- ✓ 18 souches d'*A. carbonarius*,
- ✓ 9 souches d'*A. niger*
- ✓ 6 souches d'*A. flavus*
- ✓ 6 souches d'*A. ochraceus*
- ✓ Le reste des souches (49) a été nommé « *black Aspergillus* », i.e. *A. carbonarius* ou *A. niger*.

En conséquence, une caractérisation moléculaire est nécessaire pour confirmer l'identité des espèces et compléter les résultats obtenus.

2.1.2. Identification moléculaire

Le séquençage des ITS des 87 souches fongiques pathogènes nous a permis de classer ces souches en quatre espèces (Tableau 7) : 58 souches d'*A. carbonarius*, 17 souches d'*A. niger*, 6 souches d'*A. flavus* et 6 souches d'*A. ochraceus*.

L'espèce *A. carbonarius* représente presque 70% du total des isolats fongiques. En association avec les 17 isolats d'*A. niger*, ils représentent ce qu'on appelle « agrégats *Aspergillus noirs* ». En effet, ce groupe représente 86% du total des souches isolées à partir des raisins collectés dans les vignobles tunisiens.

2.1.3. Sélection des *Aspergillus* ochratoxinogènes isolés à partir de raisins : quantification de l'OTA par HPLC

La production d'ochratoxine A par les 87 souches pathogènes a été quantifiée par HPLC. Dans notre étude, la technique HPLC effectuée sur les 87 souches isolées, nous a permis d'identifier 17 souches productrices d'ochratoxine A, appartenant uniquement à deux espèces d'*Aspergillus*, i.e. *A. carbonarius* (13 souches) et *A. ochraceus* (4 souches) (Tableau 7). Par conséquent, les espèces fongiques d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* isolées dans notre étude n'étaient pas productrices d'OTA. On note que c'est la souche d'*Aspergillus ochraceus* ASP 73 qui a produit la valeur d'OTA la plus élevée avec 2793.54 ppm/100g, suivie par *Aspergillus carbonarius* ASP 31 avec une production de 2445.31 ppm/100g (Tableau 7).

La plupart des *Aspergillus* ochratoxinogènes ont été collectés dans la région de Zaghouan, uniquement 7 souches provenaient de la région de Mornag (Tableau 8).

On remarque que la variété Red Globe est la variété la plus attaquée par les *Aspergillus* ochratoxinogènes.

Tableau 8. Teneurs en OTA secrétées par les différentes souches d'*Aspergillus*

Souches	Site d'échantillonnage	Variété	Espèce	OTA ppm/100g mycélium
ASP23	Zaghouan	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i>	228.99
ASP31	Zaghouan	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	2445.31
ASP33	Zaghouan	Muscat d'Italie	<i>A. ochraceus</i>	58.75
ASP34	Zaghouan	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i>	211.81
ASP64	Zaghouan	Red Globe	<i>A. ochraceus</i>	12.86
ASP68	Zaghouan	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	224.86
ASP70	Zaghouan	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	130.41
ASP73	Zaghouan	Red Globe	<i>A. ochraceus</i>	2793.54
ASP76	Zaghouan	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	48.27
ASP77	Zaghouan	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	225.95
ASP78	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	63.93
ASP79	Zaghouan	Muscat d'Italie	<i>A. ochraceus</i>	1320.81
ASP81	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	18.82
ASP84	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	17.08
ASP85	Zaghouan	Muscat d'Italie	<i>A. carbonarius</i>	21.91
ASP86	Zaghouan	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	14.37
ASP87	Mornag	Red Globe	<i>A. carbonarius</i>	9.53

Sur la base de l'étude de toxigenicité des 87 souches d'*Aspergillus* par la méthode de dosage HPLC, nous avons sélectionné la souche la plus toxique de chaque genre, *i.e.* *A. carbonarius* ASP31 et *A.ochraceus* ASP73, pour les tests d'antagonismes.

2.2. Sélection des agents pathogènes responsables de la pourriture bleue des pommes

2.2.1. Isolement et identification macroscopique et microscopique des *Penicillium* à partir des pommes pourris

Après culture sur MEA pendant cinq jours à 25°C, 20 souches fongiques au total ont été isolées. En se basant sur des critères morphologiques, couleur et aspect de la colonie fongique, nous avons pu facilement distinguer les genres auxquels appartenaient nos isolats : 15 *Penicillium* *sp.*, 3 *Botrytis* *sp.* et 2 *Fusarium* *sp.* (Fig. 22).

Il en découle une grande dominance (75%) des espèces du genre *Penicillium* dans la région de Sbiba.

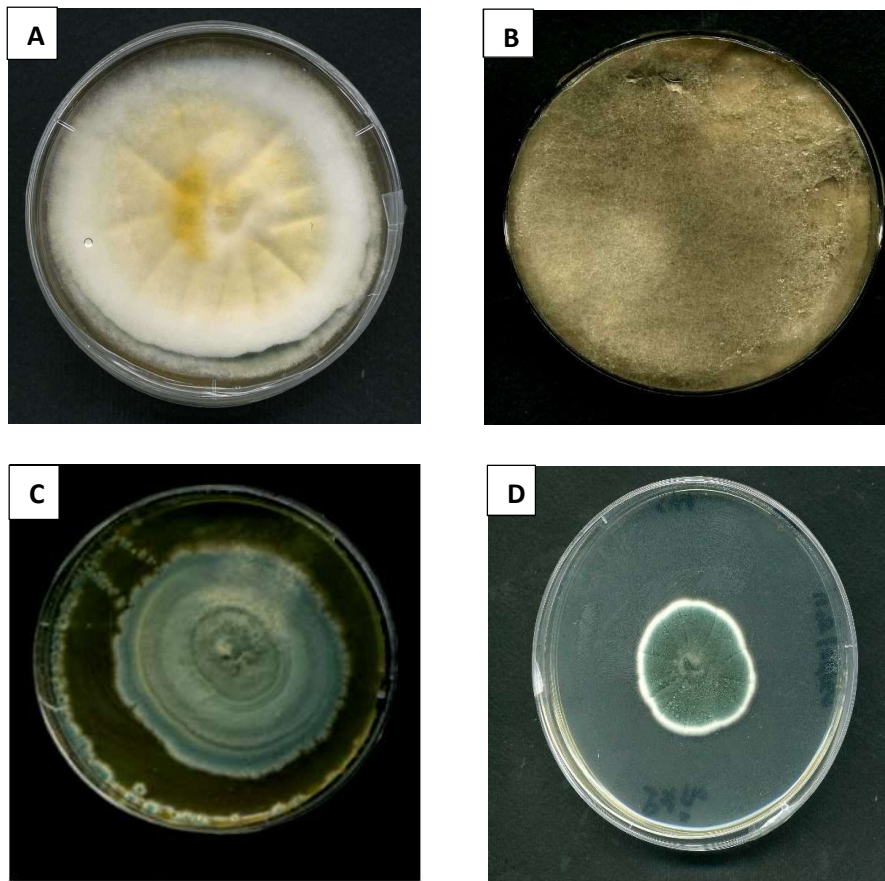


Figure 22. Aspects des colonies des différents champignons isolés à partir des pommes pourries. *Fusarium* (A), *Botrytis* (B), *Penicillium* (C et D).

Les isolats appartenant au genre *Penicillium* ont été retenus pour la suite des expérimentations, ils ont été nommés P1 à P15.

Ensuite, nous avons fait l'observation de l'aspect des *Penicillium*, à l'aide d'un microscope optique et avec un grossissement de 320x. Nous avons observé des conidiophores dressés, plus ou moins ramifiés, ressemblant à des pinceaux, avec à leurs extrémités et des phialides disposées en verticilles. Celles-ci sont insérées directement (*Penicillium* monoverticillés) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillés) ou de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillés) sur les conidiophores. Les phialides sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau (ou pénicille). Les conidies produites en grand nombre par les phialides, sont disposées en longue chaîne et contribuent à donner à la tête conidienne un aspect en pinceau (Fig. 23).

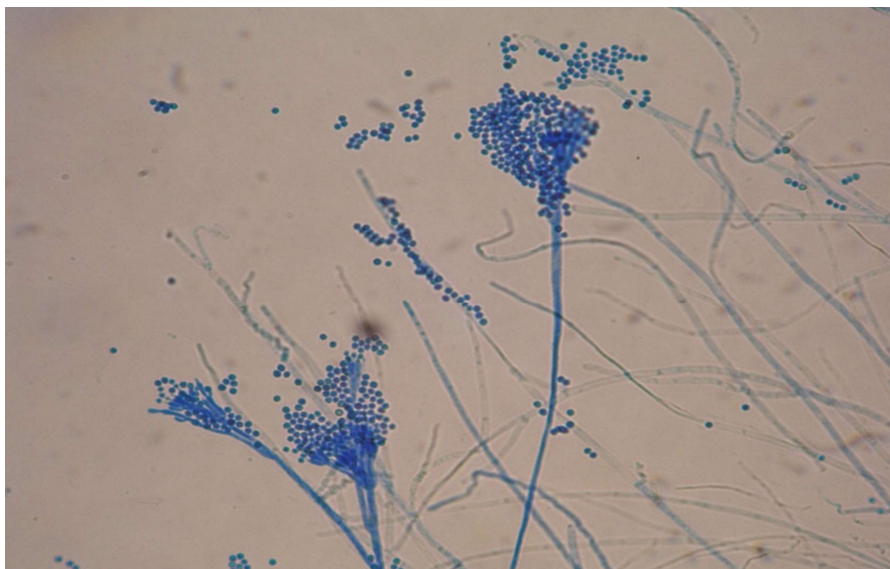


Figure 23. Aspect de *Penicillium* en microscopie optique (objectif x320).

Les observations micro- et macroscopiques ont permis de confirmer l'assignation au genre des isolats fongiques. L'identification des espèces a été effectuée par séquençage de la région ITS (ITS – 5.85 – ITS2).

2.2.2. Identification moléculaire

Le séquençage des ITS des 15 isolats du genre *Penicillium*, a permis de déterminer l'identité de l'espèce (Tableau 8). Sur un total de 15 isolats, 9 appartenant à *P. expansum*. Les six autres sont repartis au sein de 4 espèces à savoir : *P. verrucosum* (x2), *P. viridicatum* (x2), *P. roqueforti* (x1) et *P. polonicum* (x1).

Tableau 9. Origine et identification moléculaire des *Penicillium* isolés sur des pommes.

Souches	Site d'échantillonnage	Variété	Identification moléculaire ITS (% identité GenBank)
P1	Sbiba	Starkrimson	<i>P. polonicum</i> (MK267441.1, 100%)
P2	Sbiba	Starkrimson	<i>P. expansum</i> (MH879835.1, 98%)
P3	Sbiba	Golden delicious	<i>P. expansum</i> (MH879835.1, 98%)
P4	Sbiba	Starkrimson	<i>P. expansum</i> (MF467901.1, 99%)
P5	Sbiba	Golden delicious	<i>P. expansum</i> (KX243326.1, 98%)
P6	Sbiba	Starkrimson	<i>P. viridicatum</i> (KJ783271.1, 99%)
P7	Sbiba	Golden delicious	<i>P. verrucosum</i> (MH860084.1, 98%)

P8	Sbiba	Golden delicious	<i>P. verrucosum</i> (AY373937.1, 99%)
P9	Sbiba	Starkrimson	<i>P. expansum</i> (KX243326.1, 99%)
P10	Sbiba	Golden delicious	<i>P. viridicatum</i> (KJ783271.1, 99%)
P11	Sbiba	Starkrimson	<i>P. expansum</i> ((KX243326.1, 100%)
P12	Sbiba	Golden delicious	<i>P. expansum</i> (MF467901.1, 99%)
P13	Sbiba	Golden delicious	<i>P. roqueforti</i> (EU121540.1, 99%)
P14	Sbiba	Starkrimson	<i>P. expansum</i> (MF467901.1, 100%)
P15	Sbiba	Golden delicious	<i>P. expansum</i> (MH879835.1, 98%)

2.2.3. Sélection des *Penicillium* ochratoxinogènes par quantification de l'OTA par HPLC

Parmi les 15 souches de *Penicillium* testées, trois seulement étaient productrices d'ochratoxine A (Tableau 10).

La quantité d'OTA produite variait de 73.67 à 1643.83 ppm /100g mycélium. La valeur la plus élevée appartenait à la souche *P. verrucosum* P8 et la valeur la plus faible, à la souche *P. viridicatum* P8.

Tableau 10. Quantités d'OTA secrétées par les trois souches de *Penicillium*.

Souche	Site d'échantillonnage	Variété	Espèce	OTA ppm/100g mycélium
P7	Sbiba	Golden delicious	<i>P. verrucosum</i>	365.20
P8	Sbiba	Golden delicious	<i>P. verrucosum</i>	1643.83
P10	Sbiba	Golden delicious	<i>P. viridicatum</i>	73.67

En se basant sur les critères toxino-gènes, nous avons sélectionné la souche P8 (*P. verrucosum*) pour les essais de lutte.

3. Discussion

L'objectif de cette étude a été d'isoler, d'identifier et de sélectionner des espèces fongiques ochratoxinogènes. Notre étude a été menée sur des isolats de *Penicillium* et d'*Aspergillus*.

L'isolement à partir des raisins nous a permis d'obtenir quatre espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, i.e. *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. niger*. Ces espèces font partie des pathogènes fongiques associés aux dépérissements de plusieurs plantes telles que les céréales (Broydé et Thierry, 2013), le café (Durand, 2012) mais également les arbres fruitiers

et surtout la vigne à l'échelle mondiale (Ayoub *et al.*, 2010; Pisani *et al.*, 2015; Palumbo *et al.*, 2016). Ces champignons sont connus comme étant des pathogènes des régions tropicales et subtropicales (Palumbo *et al.*, 2016), ce qui explique probablement leur présence dans les vignobles tunisiens caractérisés par un climat relativement chaud, de type méditerranéen.

Les résultats de l'identification moléculaire ont montré que *A. carbonarius* était l'espèce la plus dominante : parmi les 87 isolats fongiques, 58 étaient appartenait à cette espèce, ce qui représente presque 70% des souches isolées sur les raisins collectés. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de Ayoub *et al.* (2010) et Palumbo *et al.* (2016) qui ont rapporté que les agrégats d'*A. carbonarius* sont les principaux contaminants fongiques des raisins de table. Nous avons constaté également que 17 isolats sont des *A. niger*. Cette espèce qui rejoint *A. carbonarius* pour constituer ce qu'on appelle « agrégats *Aspergillus* noirs ». Ces agrégats représentent 86% du total des souches isolées à partir des raisins. Nos résultats sont concordant avec ceux de El khoury et Atoui (2010), qui ont observé que les espèces d'*Aspergillus* noirs (à savoir les agrégats *A. niger*, *A. carbonarius*) étaient les plus courantes et constituaient 87% des *Aspergillus* isolés des raisins à la véraison et à la récolte dans les vignobles libanais. Plusieurs autres travaux confirment nos résultat et montrent que les *Aspergillus* noirs sont les espèces plus retrouvées dans les vignobles méditerranéens en France (Filofteia Diguta, 2011), en Italie (Spadaro *et al.*, 2012) et en Espagne (Martinez-Culebras *et al.*, 2007). Des relevés menés dans différents pays ont révélé que *A. carbonarius* et *A. niger* sont les *Aspergillus* les plus prédominant dans les vignes (Serra *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2006; Bejaoui *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2006; Tjamos *et al.*, 2006; Tsitsigiannis *et al.*, 2012). Outre leur capacité à causer la pourriture noire, ils peuvent également produire de l'ochratoxine A (OTA), une mycotoxine qui suscite un intérêt croissant dans le monde entier (El khoury *et al.*, 2010). En plus de ces deux espèces d'*Aspergillus* isolées à partir des raisins de vignobles tunisiens, nous avons constaté la présence de deux autres espèces fongiques du même genre, *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux espèces dans les vignobles tunisiens a été signalée par Melki Ben fredj *et al.* (2006). Dans des études antérieures, ces deux espèces ont également été détectées dans des vignobles français (Filofteia Diguta, 2011), libanais (El khoury *et al.*, 2011) et portugais (Rodriguez *et al.*, 2007).

En ce qui concerne la capacité de production de l'OTA par les champignons obtenus dans les vignobles tunisiens, nos résultats confirment fortement qu'*A. carbonarius* est sans aucun doute le principal producteur d'OTA dans la section Nigri d'*Aspergillus*. Ce fait est dû au pourcentage élevé de ces isolats ochratoxigéniques, puisque parmi les 87 souches isolées, 17 souches étaient

productrices et 13 étaient des *A. carbonarius* avec une grande capacité de production (la souche la plus productrice est ASP31). Les résultats obtenus dans d'autres études sur les champignons producteurs d'OTA réalisées en Espagne (Castella *et al.*, 2018), au Portugal (Serra *et al.*, 2006), en Italie (Gerin *et al.*, 2018), en France (Filofteia Diguta, 2011) et au Liban (El khoury *et al.*, 2011) ont également montré qu'*A. carbonarius* est considéré comme le principal producteur d'OTA et que son potentiel ochratoxigénique était non seulement occasionné par son caractère toxigène intrinsèque, mais aussi par son agressivité (Battilani *et al.*, 2006 ; El khoury *et al.*, 2011). Nos résultats montrent également que les quatre autres souches productrices appartenaient à l'espèce *A. ochraceus*, dont la souche ASP73 était la plus toxigène. Cette espèce a été considérée depuis longtemps comme le principal producteur d'OTA et considérée comme l'un des contaminants majeurs des aliments par cette toxine (El Khouey, 2006; Kapetanakou *et al.*, 2009).

Il est également intéressant de noter que la plupart des *A. carbonarius* ochratoxinogènes ont été collectés dans la région de Zaghouan, les autres souches provenant de la région de Mornag. Par conséquent, la région de Zaghouan pourrait être considérée comme une source particulière d'inoculum qui pourrait causer des pertes de rendement sous une haute pression de la maladie. La région de Mornag, où la culture de la vigne est importante et occupe de grandes superficies, semble également être infectée par cette espèce ochratoxinogène; ce qui a déjà été démontré par Lasrem *et al.* (2011).

La variété Red Globe est la variété la plus attaquée par les *Aspergillus* ochratoxinogènes. Cette variété nouvellement introduite en Tunisie peut être une source importante de contamination par l'OTA. Cette variété s'est avérée sensible à la maladie ; en 2006, les baies de raisin de plusieurs Red Globe des vignobles du comté de Kern, en Californie, ont présenté des sporulations de champignons noirs et des symptômes typiques de pourriture noire, c'était le premier cas signalé de la contamination à l'*A. carbonarius* des raisins en Californie (Roney-Latham *et al.*, 2008).

En outre, l'isolement à partir des pommes a donné trois autres espèces de champignons, *i.e.* *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., et *Penicillium* spp. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Atrassi *et al.* (2005) qui ont pu isoler plusieurs espèces fongiques à partir de pommes pourries.

Notre étude vise la recherche de *Penicillium* spp. étant donné que ce genre possède des espèces pathogènes destructrices qui provoquent la pourriture dans de nombreux fruits populaires, tels que les pommes et les poires, lors de la manutention et de la conservation après la récolte. Ce

genre provoque des impacts socio-économiques et a des implications pour le commerce international, et surtout, parce que les agents pathogènes qu'il contient peuvent également conduire à de graves problèmes de santé chez l'homme via la production de métabolites secondaires toxiques, notamment la patuline (Chen *et al.*, 2017).

Une collection de *Penicillium* spp. a été réalisée à partir d'isollements effectués sur des pommes pourries : 9 souches de *P. expansum*, 2 souches de *P. verrucosum*, 2 souches de *P. viridicatum*, 1 *P. roqueforti* et 1 *P. polinocum*. L'espèce la plus abondante est *P. expansum*, c'est un champignon filamenteux répandu, et l'un des principaux agents responsables de la pourriture des fruits qui entraîne d'énormes pertes économiques lors du stockage et de l'expédition post-récolte. *P. expansum* est le principal contaminant des pommes (Chen *et al.*, 2017). D'ailleurs, le nombre élevé de souches de *P. expansum* isolées sur les pommes en Tunisie est en concordance avec plusieurs travaux qui montrent que la pourriture bleue causée par *P. expansum* est la maladie la plus répandue des pommes en post-récolte (Sholberg et Conway, 2004; Tannous, 2015; Chen *et al.*, 2017).

L'étude du pouvoir toxigène des souches fongiques a été réalisée par quantification des OTA par HPLC. Nous avons identifié deux espèces productrices, *i.e.* *P. verrucosum* et *P. viridicatum*. Il est clair que la présence de souches sécrétrices d'OTA sur les pommes nous renseigne sur le danger potentiel de la contamination des pommes par cette toxine dans les entrepôts frigorifiques en Tunisie. Ces champignons toxigènes présentent un risque avéré dont le secteur des pommes doit tenir compte pour obtenir des produits de qualité, sans danger pour le consommateur. La souche P8 de *P. verrucosum* s'est montrée la plus ochratoxinogène. Plusieurs études ont confirmé que cette espèce est le principal producteur d'OTA de son genre, à côté des *Aspergillus* (Weidenburner, 2001; FAO/WHO, 2009; Mally *et al.*, 2009; El Khoury et Atoui 2010; Marin *et al.*, 2013; Vettorazzi *et al.*, 2013; Tannous, 2015; Chen *et al.*, 2017). De plus, *P. verrucosum* a été identifié comme le principal producteur d'OTA dans les céréales dans les régions aux climats tempérés (Lund *et al.*, 2003).

D'autres espèces de *Penicillium* ont été également rapportées ochratoxinogènes mais des études de confirmation sont nécessaires. Pendant plusieurs années, *P. verrucosum* et *P. nordicum* ont été les seules espèces productrices d'OTA signalées dans le genre *Penicillium*. Cependant, au cours du siècle dernier, les *P. viridicatum* ont été classés comme producteurs d'OTA. *P. verrucosum* a été détecté dans certains produits à base de viande séchée et certains fromages et a été responsable de leur contamination avec l'OTA (Chen *et al.*, 2017).

4. Conclusion

La présente étude a montré que la variété de raisins Red Globe est la plus sensible aux attaques fongiques ochratoxinogènes. Dans le cas des pommes, c'est la variété Golden délicieux qui était la plus sensible.

Parmi les 87 souches d'*Aspergillus* isolées à partir des raisins, 17 étaient productrices d'OTA, une toxine redoutable pour la santé humaine. Ces souches appartenaient uniquement à deux espèces d'*Aspergillus*, *i.e.* *A. carbonarius* et *A. ochraceus*. Nous avons sélectionné la souche la plus toxique de chaque groupe, *i.e.* ASP 31 (*A. carbonarius*) et ASP 73 (*A. ochraceus*) pour les essais de lutte *in vitro* et *in vivo*.

Dans le cas de *Penicillium*, parmi les 15 souches isolées à partir des pommes, trois souches seulement étaient productrices d'OTA, elles appartenaient à deux espèces, *i.e.* *P. verrucosum* et *P. expansum*. La souche P8 de *P. verrucosum* s'est montrée la plus ochratoxinogène, de ce fait elle a été sélectionnée pour les essais de lutte.

Chapitre II

Etude de la communauté bactérienne colonisant les sols des vignobles tunisiens et sélection des antagonistes

Mayssa Arfaoui, Jessica Vallance, Emilie Bruez, Awatef Rezgui, Imen Melki, Samir Chebil, Najla Sadfi-Zouaoui, Patrice Rey. Isolation, identification and *in vitro* characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes. Biological control 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.019>

1. Introduction

Ces dernières années, l'OTA a fait l'objet de nombreuses études dans le monde en raison de son danger pour la santé humaine et animale (El khoury *et al.*, 2010). Cette toxine possède des propriétés néphrotoxiques, cancérigènes et tératogènes très fortes et des propriétés immunosuppressives en raison desquelles elle a été classée par le Centre International de Recherche sur le Cancer dans le groupe 2B (CIRC, 1993). Les ochratoxines sont les métabolites secondaires des espèces fongiques du genre *Aspergillus* et *Penicillium*.

Afin de réduire le risque d'exposition du consommateur à cette mycotoxine, les efforts de recherche ont principalement porté sur la mise au point de méthodes de contrôle visant à limiter les espèces ochratoxigéniques qui peuvent coloniser les parties endommagées des plantes et ainsi contaminer la chaîne viticole. Lorsque cela est autorisé, l'application des composés antifongiques est une approche très efficace pour prévenir la production de mycotoxines.

L'objectif de ce chapitre est de trouver des souches bactériennes à caractère antagoniste. La stratégie choisie a consisté à isoler et caractériser des micro-organismes naturellement présents dans le sol des vignobles tunisiens afin de les gérer et d'assurer une protection des plantes et des fruits lors d'essais ultérieurs.

2. Résultats

2.1. Caractérisation des souches bactériennes isolées de la rhizosphère des vignobles tunisiens

2.1.1. Isolement des bactéries rhizosphériques des vignobles tunisiens

Dans cet essai, 109 isolats bactériens ont été établis à partir des 20 échantillons de sol collectés dans deux parcelles viticoles tunisiennes, une biologique et une conventionnelle. Les 39 souches les plus abondantes selon des critères morphologiques ont été sélectionnées et caractérisées par des approches phénotypiques et moléculaires. (Tableau 11).

2.1.2. Identification moléculaire par séquençage des gènes ADNr 16S et *rpoB*

Basé sur le séquençage partiel des gènes d'ADNr 16S et *rpoB* (Tableau 11), la majorité des isolats bactériens sont affiliés au genre *Bacillus* (35 souches): *Bacillus velezensis* (7 souches), *B. amyloliquefaciens* (6 souches), *B. endophyticus* (4 souches), *B. safensis* (4 souches), *B. pumilus* (3 souches), *B. subtilis* (3 souches), *B. thuringiensis* (2 souches), *B. mojavensis* (1 souche), *B. weihenstephanensis* (1 souche), *B. simplex* (1 souche), *B. cereus* (1 souche) et 3

souches de *Bacillus sp.* D'autres espèces bactériennes ont été identifiées : l'espèce *Brevibacterium* (2 souches), à savoir *Brevibacterium halotolerans* (1 souche) et *B. frigoritolerans* (1 souche), *Microbacterium oxydans* (1 souche) et *Paenibacillus sp.* (1 souche).

Les séquences des ADNr 16S et *rpoB* de nos souches bactériennes sont disponibles dans la base de données Genbank sous les numéros d'accès MH236385 à MH236421.

2.2.3. Détection des gènes codants pour deux familles d'antibiotiques

Les 5 gènes codant pour les antibiotiques ciblés ont été détectés chez les trois souches : *Bacillus sp.* G3AM1, *B. mojavensis* G4B2 et *B. subtilis* G4A1. 21 souches possédaient les 4 gènes de la fengycine (19 *Bacillus spp.*, *Paenibacillus spp.* et *Brevibacterium halotolerans*) tandis que les autres souches exprimaient au moins 1 gène sur les 5 testés. Pour la souche de *B. simplex* K2E1, aucun des 5 gènes n'a été détecté (Tableau 11).

2.2.4. Dépistage des caractères antagonistes favorisant la croissance des plantes (PGP)

En ce qui concerne les caractères PGP, à savoir la solubilisation du phosphate (Figure 24) et la production de sidérophores, seules 4 souches sur 39 ont démontré à la fois les caractéristiques évaluées : *B. pumilus* G3AX, *B. velezensis* G3AX1M et G3A, et *Bacillus sp.* K2E1X (Tableau 11). Aucune des autres souches n'a pu solubiliser les phosphates alors que toutes les bactéries produisent des sidérophores. Trois souches ont produit les plus grandes zones de halo (Fig. 25), allant de 14.5 à 18 mm (souches +++), et 23 souches ont développé des petits halos allant de 1 à 5 mm (souches +).



Figure 24. Halo formé par la souche G3AX de *B. pumilus* suite à la solubilisation du phosphate après incubation pendant 15 jours sur milieu gélosé PVK à 28°C.

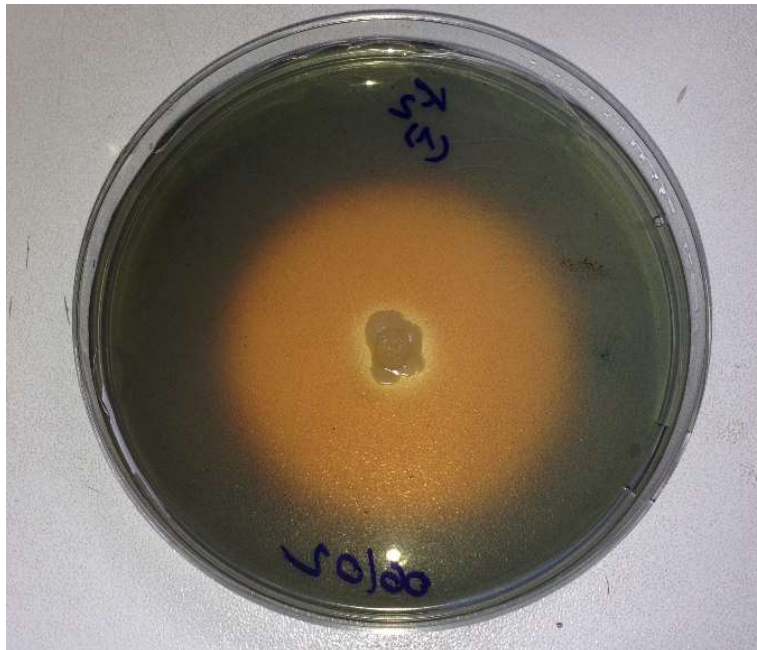


Figure 25. Production de sidérophores (+++) : Halo orange se forme autour des colonies bactériennes suite à l'élimination de Fe^{3+} après incubation pendant 7 jours à 25°C sur milieu CAS.

Tableau 11. Description et caractérisation *in vitro* des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de sols de vignobles tunisiens.

Souches	Nature de la parcelle	Identification moléculaire					Facteurs de promotion de croissance des plantes			
		Gène ADNr 16S (GenBank %id)	Gène <i>rpoB</i> (GenBank %id)	FeA	FeB	FeD	FeE	Bacc	Solubilisation des phosphates	Production de sidérophores
KD1	Conv	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (99%)	-	+	+	-	+	-	-	+++
I3L	Org	<i>Paenibacillus</i> sp. (97%)	-	+	+	+	+	-	-	++
G3AM1	Org	<i>Bacillus</i> sp. (97%)	<i>Bacillus</i> sp. (97%)	+	+	+	+	+	-	+
G3AX1	Org	<i>Bacillus siamensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	+
G4B2	Org	<i>Bacillus mojavensis</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	-	+
G3AF2	Org	<i>Microbacterium oxydans</i> (99%)	-	+	-	-	-	-	-	+
J4F	Org	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100 %)	+	+	+	+	-	-	+
G3	Org	<i>Bacillus endophyticus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	+	+	+	+	-	-	+
G5	Org	<i>Bacillus endophyticus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	+	+	+	+	-	-	+
I1	Org	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (99%)	-	+	+	+	+	-	-	+
I2	Org	<i>Bacillus axarquiensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	+
I2M	Org	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	++
J4C	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	-	+	-	-	++
J4D	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	++
G5A1	Org	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	+	+	+	-	-	-	++
G5D	Org	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	+
G3AX2	Org	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	+	+	+	+	-	-	+
G3AX	Org	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	-	+	+	+	+	-	+	+
k2	Conv	<i>Bacillus</i> sp. (98%)	-	+	+	-	+	-	-	+++
I4	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	+
M4	Conv	-	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	+	-	-	-	-	-	+
K4S	Conv	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	+	+	+	+	-	-	+
L2	Conv	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	++

Souches	Nature de parcelle	Identification moléculaire					Facteurs de promotion de croissance des plantes			
		Gène ADNr 16S (GenBank %id)	Gène <i>rpoB</i> (GenBank %id)	FeA	FeB	FeD	FeE	Bacc	Solubilisation des phosphates	Production de sidérophores
L3	Conv	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	-	+	+	-	-	-	-	+
J4F1X	Org	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	+	-	-	+	-	-	+
K2E1	Conv	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	-	-	-	-	-	-	-	+
I2C	Org	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	+
G4B1	Org	<i>Bacillus subtilis</i> (100%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+
G3AX1M	Org	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	-	-	+	+	-	+	+
G4A1	Org	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	-	++
G3A3	Org	<i>Bacillus axarquiensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	-	+	-	-	++
G5C	Org	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	-	+	-	+	-	-	-	+
J1XM	Org	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	-	+	+	+	+	-	-	+
K3	Conv	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	-	-	-	-	-	+++
G3A2	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	++
K2E1X	Conv	<i>Bacillus</i> sp. (98%)	-	+	+	-	+	-	+	+
G3AF1	Org	<i>Brevibacterium halotolerans</i> (99%)	-	+	+	+	+	-	-	+
J4FS	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	+	+	-	-	++
G3A	Org	-	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	-	+	+

Org: Parcelles biologiques, Conv: Parcelles conventionnelles, Bacc: bacillomycine, Fe: fengycine.

2.2. Profils physiologiques (CLPP) des rhizobactéries

Le calcul de l'AWCD (Average Well Color Development - ou développement moyen de couleur des puits) pour chacun des isolats a montré que la totalité des souches bactériennes était capable de cataboliser au moins 7 sources carbonées après 24h, plus de la moitié des sources après 48h, et presque la totalité des sources après 120h d'incubation des plaques (Fig. 26).

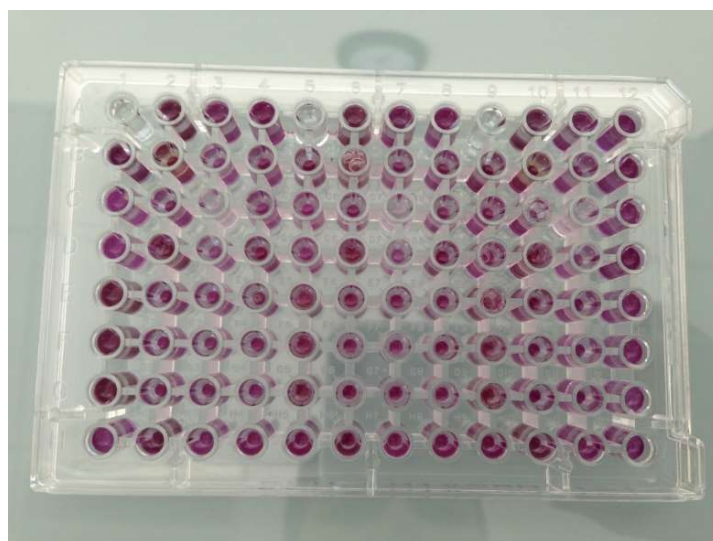


Figure 26. Plaque Biolog Ecoplate ensemencée avec *Bacillus pumilus* (G3AX) en fin de réaction (120h)

La répartition des souches sur le plan principal généré par l'ACP est représentée sur la Figure 27. Les valeurs propres des deux premiers axes, Dim 1 et Dim 2, expliquent 47,2% de la variabilité totale. Globalement, aucune tendance particulière dans l'utilisation des sources de carbone n'a été observée entre les 39 souches bactériennes isolées de la rhizosphère du vignoble tunisien (données non présentées), sauf lorsque le type de gestion culturale était considéré. Les espèces bactériennes métabolisent différemment les glucides et les acides aminés en fonction du système agricole, *i.e.* biologique ou conventionnel (Fig. 27).

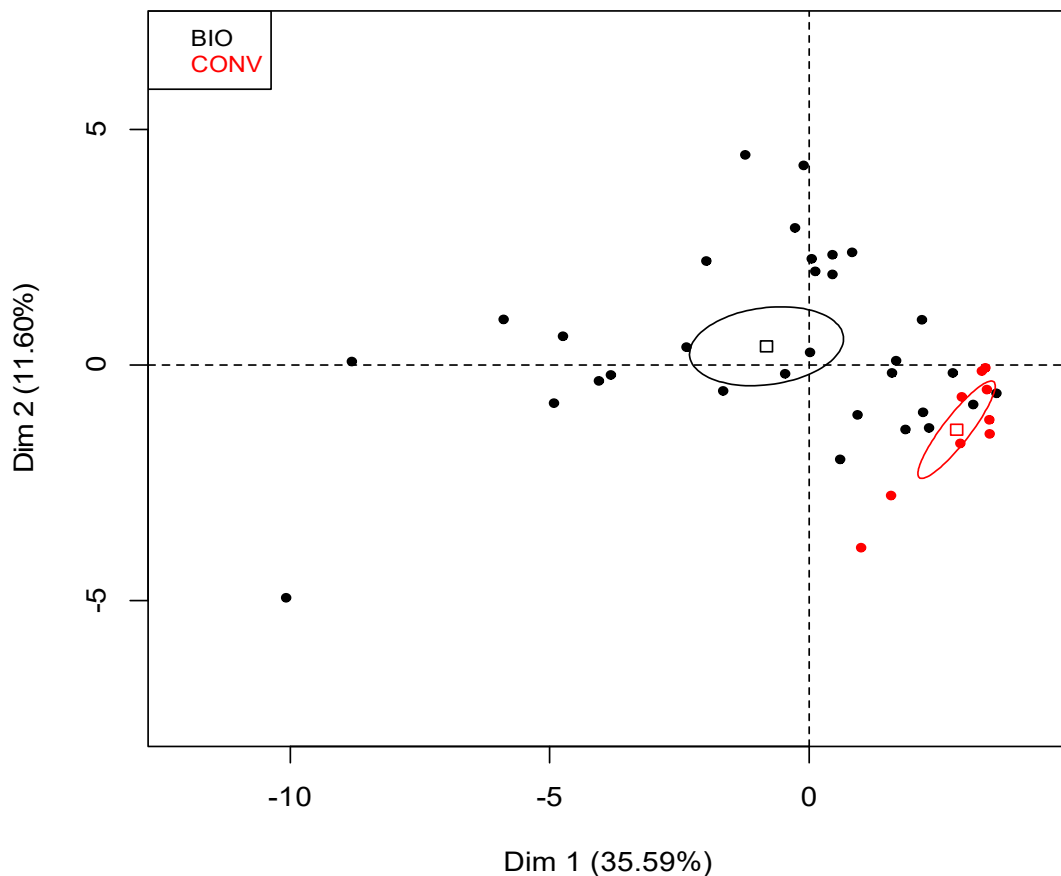


Figure 27. Analyse en Composantes Principales (ACP) des souches rhizobactériennes isolées du vignoble tunisien en fonction de leurs profils cataboliques obtenus avec des plaques Biolog Ecoplates. Les points représentent la moyenne de 3 échantillons répétés. La variation (%) expliquée par chaque axe est indiquée entre parenthèses. Les plaques Biolog Ecoplates ont été incubées pendant 48h à 27°C dans l'obscurité.

Sur la base des tests de caractérisation décrits précédemment, les 21 souches bactériennes les plus prometteuses ont été choisies pour tester leur potentiel d'agent de lutte biologique contre *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. verrucosum* (résultats présentés au chapitre III).

3. Discussion

Le but de cette étude était d'isoler des souches bactériennes efficaces ayant la capacité de contrôler ou au moins de réduire les effets toxiques de deux agents pathogènes ochratoxigéniques sur les baies de raisin, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*, et l'agent responsable de LA pourriture bleue des pommes, *Penicillium verrucosum*. A notre connaissance, ceci est le premier rapport décrivant par des approches moléculaires,

microbiologiques et biochimiques des souches de rhizobactéries ayant des propriétés antagonistes et qui colonisent les sols de vignobles tunisiens organiques et conventionnels.

La caractérisation moléculaire des bactéries échantillonnées a été réalisée par séquençage de l'ADNr 16S et a montré que ces isolats appartenaient aux genres *Bacillus* (35 souches), *Brevibacterium* (1 *B. frigoritolerans* et 1 *B. halotolerans*), *Microbacterium* (1 *M. oxydans*) et *Paenibacillus* sp. (1 souche). Comme certaines souches de *Bacillus* spp. n'ont pas pu être identifiées sur la base du gène de l'ADNr 16S, nous avons fait le séquençage du gène codant la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) pour identifier 11 espèces de *Bacillus*: *B. velezensis* (7 souches), *B. amyloliquefaciens* (6 souches), *B. endophyticus* (4 souches), *B. safensis* (4 souches), *B. pumilus* (3 souches), *B. subtilis* (2 souches), *thuringiensis* (2 souches), *B. cereus* (1 souche), *B. mojavensis* (1 souche), *B. simplex* (1 souche) et *B. weihenstephanensis* (1 souche) (Tableau 9). Certains de ces *Bacillus* spp. sont décrits dans la littérature comme étant de fréquents et communs colonisateurs des organes et tissus de la vigne, c'est-à-dire des fleurs, baies, feuilles, graines, racines et vaisseaux (Compant *et al.*, 2011; Marasco *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2014; Rezgui *et al.*, 2016; West *et al.*, 2010).

Il est connu que les micro-organismes associés aux plantes, en particulier les *Bacillus* spp., peuvent favoriser leur croissance et leur développement par un certain nombre de mécanismes. Parmi lesquels se trouvent l'inhibition de la croissance des microorganismes phytopathogènes (Beneduzi *et al.*, 2012; Choudhary et Johri (2009). Nos résultats confirment ces rapports précédents en montrant que les souches bactériennes habitant les sols des vignobles tunisiens possèdent des caractères antagonistes, à savoir des gènes codant pour des antibiotiques, la production de sidérophores, la métabolisation des sources de carbone et un facteur de promotion de croissance des plantes, à savoir la solubilisation du phosphate. Toutes les souches de *Bacillus* isolées ont exprimé différemment au moins un des 5 gènes antibiotiques étudiés (4 fengycines et 1 bacillomycine). Seulement trois souches de *Bacillus*, à savoir *Bacillus* sp. G3AM1, *B. mojavensis* G4B2 et *B. subtilis* G4A1, possédant les 5 gènes codants. Les familles de l'iturine (Bacillomycine) et de la fengycine ont montré une forte action antifongique *in vitro* contre une grande variété de levures et champignons (Li *et al.*, 2016). Les fengycines sont des lipopeptides biologiquement actifs produits par plusieurs souches de *Bacillus subtilis*, connues pour avoir une activité antifongique contre les champignons filamenteux probablement en rendant la membrane plasmique de la cellule cible plus perméable (Deleu *et al.*, 2008; Jourdan *et al.*, 2009).

De nombreux travaux ont montré que plusieurs mécanismes antifongiques déployés des espèces de *Bacillus* incluent entre autres la production des sidérophores, qui sont des chélateurs de fer naturels importants et qui représentent une nouvelle classe d'antibiotiques ayant un potentiel thérapeutique considérable (Pluhacek *et al.*, 2016). Nos résultats ont indiqué que toutes les bactéries isolées produisaient des sidérophores; l'espèce la plus productive était la souche *Brevibacterium frigoritolerans* KD1. Les souches de ce genre sont fréquemment rapportées comme étant de grandes productrices de sidérophores, comme l'ont déjà montré Noordman *et al.* (2006) et Pham *et al.* (2017).

Le métabolisme des souches bactériennes isolées des deux vignobles tunisiens a également été étudié avec la méthode des plaques Biolog Ecoplate. Les résultats ont montré que les rhizobactéries métabolisaient les sources de carbone de la même manière, mais qu'elles métabolisaient différemment les glucides et les acides aminés selon le système de production, c'est-à-dire biologique ou conventionnel (47,2% de la variabilité totale). Dans le même contexte, Rezgui *et al.* (2016) ont rapporté que le groupe des glucides était le plus métabolisé par leurs 19 souches, *Pantoea agglomerans* étant la plus efficace.

Concernant la solubilisation des phosphates, des études antérieures (Kang *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2017) ont montré que les souches de *Bacillus* sp., par exemple *B. pumilus* et *B. megaterium*, possédaient une forte capacité à solubiliser les phosphates. Dans notre étude, sur les 39 isolats évalués, seulement 3 souches du genre *Bacillus* ont pu solubiliser le phosphate en très petites quantités : *B. pumilus* (G3AX), *B. velezensis* (G3AX1M) et *Bacillus* sp. (K2E1X). Le phosphore est, après l'azote, le deuxième élément clé en termes de besoins quantitatifs pour l'alimentation minérale des plantes. Il joue un rôle important dans l'augmentation des ramifications des racines et dans la capacité des plantes à résister aux maladies (Sharma *et al.*, 2013).

Sur la base des critères décrits ci-dessus, 21 souches ont été sélectionnées pour des expériences *in vitro* afin de tester leurs capacités antagonistes contre deux agents pathogènes responsables de la pourriture noire des raisins, *i.e.* *A. carbonarius* et *A. ochraceus* (Allam *et al.*, 2011; Atoui *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2008; Magnoli *et al.*, 2003), et l'un des agents responsable de la pourriture bleue chez les pommes, *P. verrucosum* (Lund *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017).

4. Conclusion

La présente étude a montré que diverses souches bactériennes colonisent la rhizosphère du vignoble tunisien. L'isolement a été effectué sur deux parcelles, une biologique et l'autre

conventionnelle. L'identification moléculaire par le séquençage des gènes de l'ADNr 16S ET rpoB a montré l'assignation des 39 souches à 4 genres, à savoir : *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Mycrobacterium* et *Paenibacillus*. Nos résultats démontrent que l'espèce dominante est *Bacillus spp.*

Toutes les souches de *Bacillus* isolées ont exprimé différemment au moins l'un des 5 gènes d'antibiotiques étudiés (4 fengycines et 1 bacillomycine). Les profils physiologiques des 39 souches bactériennes ont montré que toutes dégradent le carbone de la même manière alors qu'elles métabolisaient différemment les glucides et les acides aminés en fonction du système cultural, *i.e.* biologique ou conventionnel. Seulement quatre souches, *B. pumilus* (G3AX), *B. velesensis* (G3AX1M) et (G3A) et *Bacillus* sp (K2E1X) ont démontré une capacité à solubiliser les phosphates. Nos résultats ont également indiqué que toutes les bactéries isolées produisaient les sidérophores ; l'espèce la plus productive était *Brevibacterium frigoritolerans* (KD1).

En se basant sur ces résultats, nous avons sélectionné 21 souches qui se sont montrées les meilleures candidates potentielles pour les essais de lutte contre les souches fongiques ochratoxinogènes établies.

Chapitre III

Essai de lutte biologique contre *A. carbonarius* et *A. ochraceus* sur les baies de raisin et contre *P. verrucosum* sur les pommes

Mayssa Arfaoui, Jessica Vallance, Emilie Bruez, Awatef Rezgui, Imen Melki, Samir Chebil, Najla Sadfi-Zouaoui, Patrice Rey. Isolation, identification and *in vitro* characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes. Biological control 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.019>.

1. Introduction

La pourriture fongique causée par les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* est dangereuse pour la santé de l'homme en raison de la production d'ochratoxine A (OTA). L'OTA a été classée comme cancérogène possible pour l'homme (groupe 2B) par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1993) sur la base de ses effets toxicologiques, *i.e.* la toxicité rénale, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunotoxicité (Pfohl- Leszkowicz et Manderville, 2007). Les souches d'*Aspergillus* de la section *Nigri* ont été impliquées dans la contamination des raisins et du vin par l'OTA (Bellí *et al.*, 2004; Chiotta *et al.*, 2009; Ponsone *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2004), les souches d'*Aspergillus carbonarius* étant les principales productrices de cette mycotoxine (Bau *et al.*, 2005; Sage *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2003). L'inhibition des *Aspergillus carbonarius* et des autres espèces productrices d'OTA est donc importante pour réduire la contamination des denrées alimentaires. L'utilisation de la lutte chimique étant nocive pour l'homme (Latorre et Naranjo, 2008), la lutte biologique fait donc l'objet de nombreuses études pour trouver des méthodes alternatives pour inhiber la pourriture fongique dans les fruits et les légumes (Meng et Tian, 2009).

Dans ce contexte, notre étude présentée dans ce chapitre est consacrée aux essais de lutte *in vitro* afin de sélectionner les bactéries antagonistes les plus efficaces à réduire les pourritures causées par des champignons ochratoxinogènes. La première partie du chapitre portera sur la réduction de la contamination des raisins par *Aspergillus* spp., tandis que la deuxième partie sera consacrée à l'essai de l'élimination de *P. verrucosum in vitro* et sur des pommes.

2. Résultats

2.1. Essais de lutte biologique *in vitro* contre *Aspergillus* sur baies de raisin

Dans cette première partie du chapitre nous avons procédé à des essais *in vitro* et *in vivo* pour tester l'effet antagoniste des souches bactériennes contre les deux souches ochratoxinogènes d'*Aspergillus* sélectionnées précédemment, *A. carbonarius* ASP31 et *A. ochraceus* ASP73.

2.1.1. Antagonisme bactérien *in vitro* contre deux champignons ochratoxigéniques

L'étude du phénomène d'inhibition de la croissance mycélienne *in vitro* des souches toxigènes a été mis en évidence par le mécanisme d'antibiose, et effectué selon deux méthodes, la confrontation directe et l'émission de substances volatiles (Fig. 28).

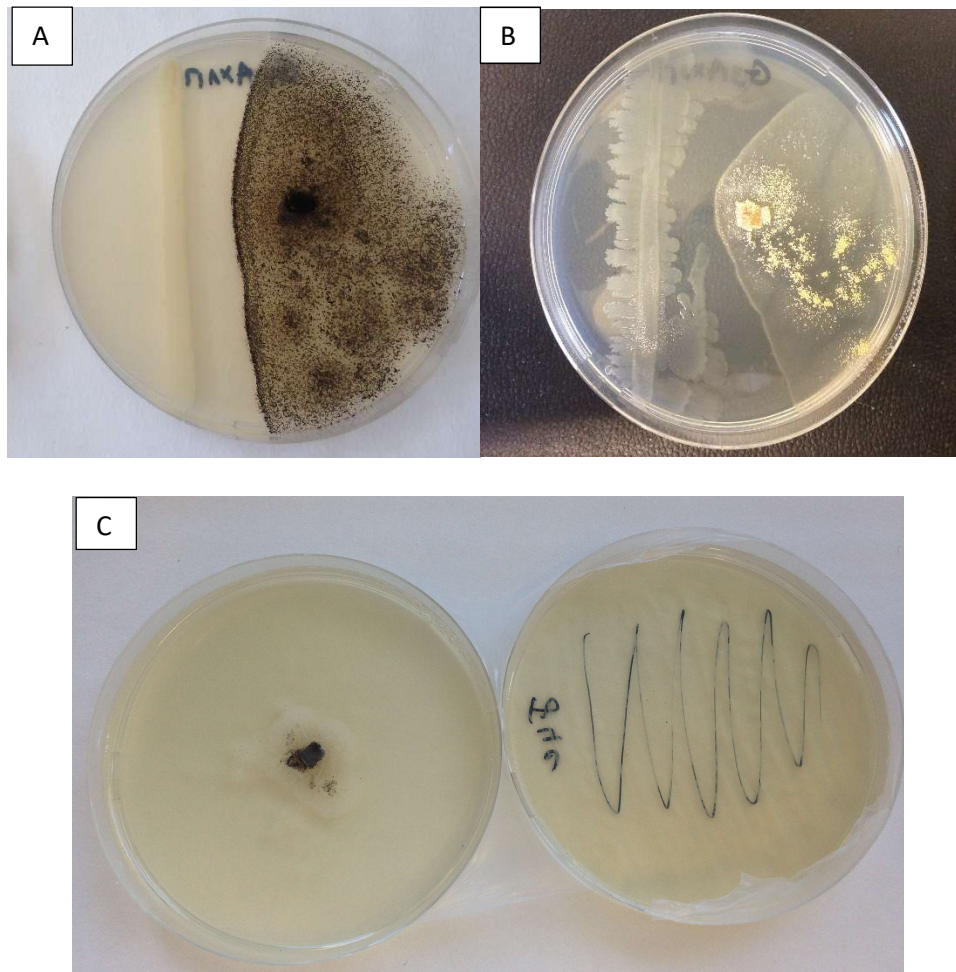


Figure 28 Antagonisme *in vitro* : Confrontation directe contre *A. carbonarius* (A) et *A. ochraceus* (B) ; Substances volatiles (C), après incubation à 27°C à l'obscurité pendant 5 et 7 jours.

2.1.1.1. Confrontation directe

Les 21 souches bactériennes sélectionnées présentaient des pourcentages d'inhibition variables pour la croissance des deux agents pathogènes fongiques testés, à savoir *A. carbonarius* ($P < 0.01$) et *A. ochraceus* ($P < 0.01$). La réduction de croissance était comprise entre 12 et 81%, et 17% à 85%, respectivement pour *A. carbonarius* (Fig. 29) et *A. ochraceus* (Fig. 30).

Dans le cas de l'espèce pathogène *A. carbonarius*, la bactérie antagoniste la plus efficace était *Bacillus pumilus* (G3AX) avec un fort pourcentage d'inhibition allant jusqu'à 80,1% (Fig. 29). Concernant l'espèce *A. ochraceus*, *Bacillus amyloliquefaciens* (I2) s'est montré la plus efficace

avec une inhibition de la croissance fongique de 85% suivie par *Bacillus pumilus* souche G3AX (Figure 30).

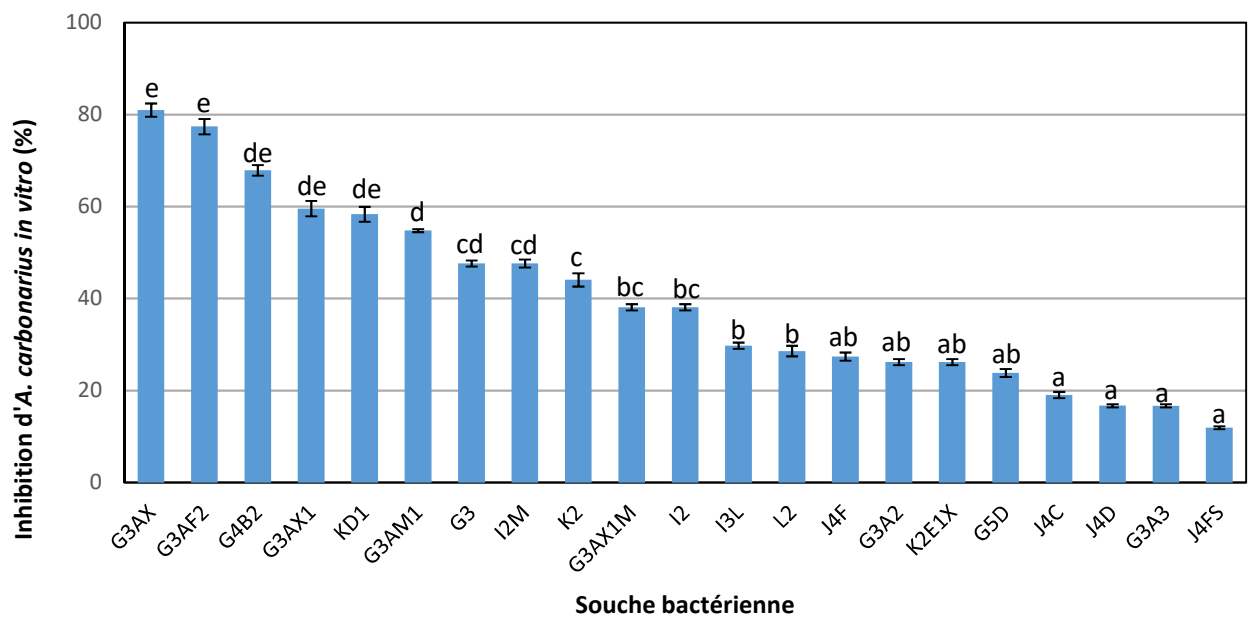


Figure 29. Effet des rhizobactéries sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Aspergillus carbonarius*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P>0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis.

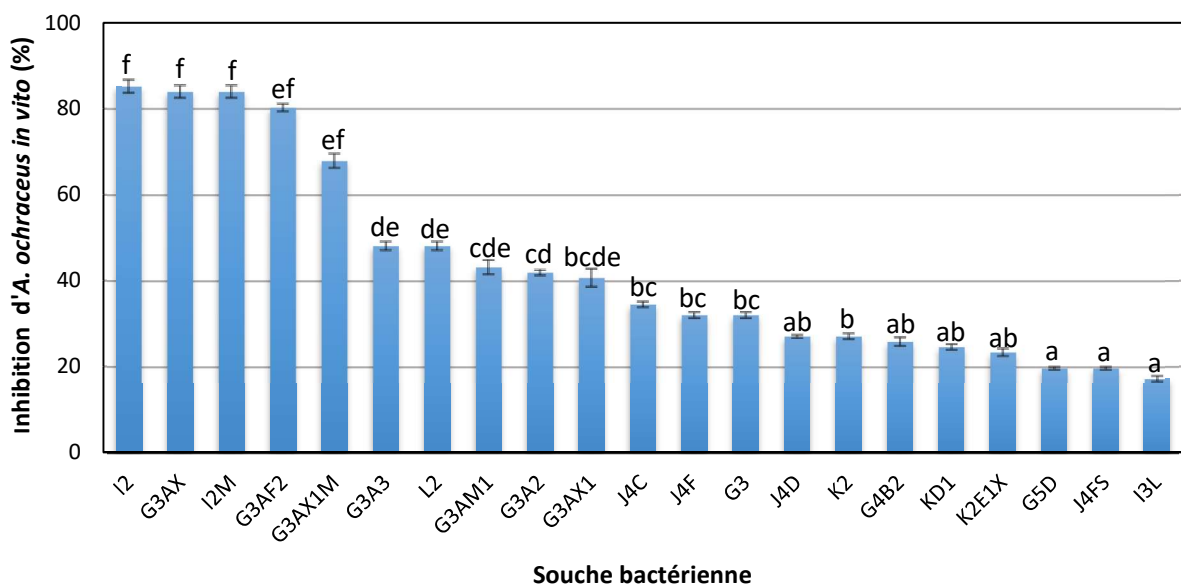


Figure 30. Effet des rhizobactéries sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Aspergillus ochraceus*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour

chaque souche testée. Les barres d’histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P>0.05$) d’après le test de Kruskal-Wallis.

2.1.1.2. Substances bactériennes volatiles

Les 21 isolats bactériens testés ont montré une forte inhibition de la croissance fongique par l’émission de substances organiques volatiles. Les pourcentages d’inhibition des deux agents ochratoxinogènes testés sont très variables : de 20 à 93% et de 8 à 98% respectivement pour *A. carbonarius* (Fig. 31) et *A. ochraceus* (Fig. 32). Les bactéries antagonistes les plus efficaces étaient *Bacillus amyloliquefaciens* (I2) et *Bacillus sp.* (G3AM1) respectivement contre *A. carbonarius* (Fig. 31) et *A. ochraceus* (Fig. 32).

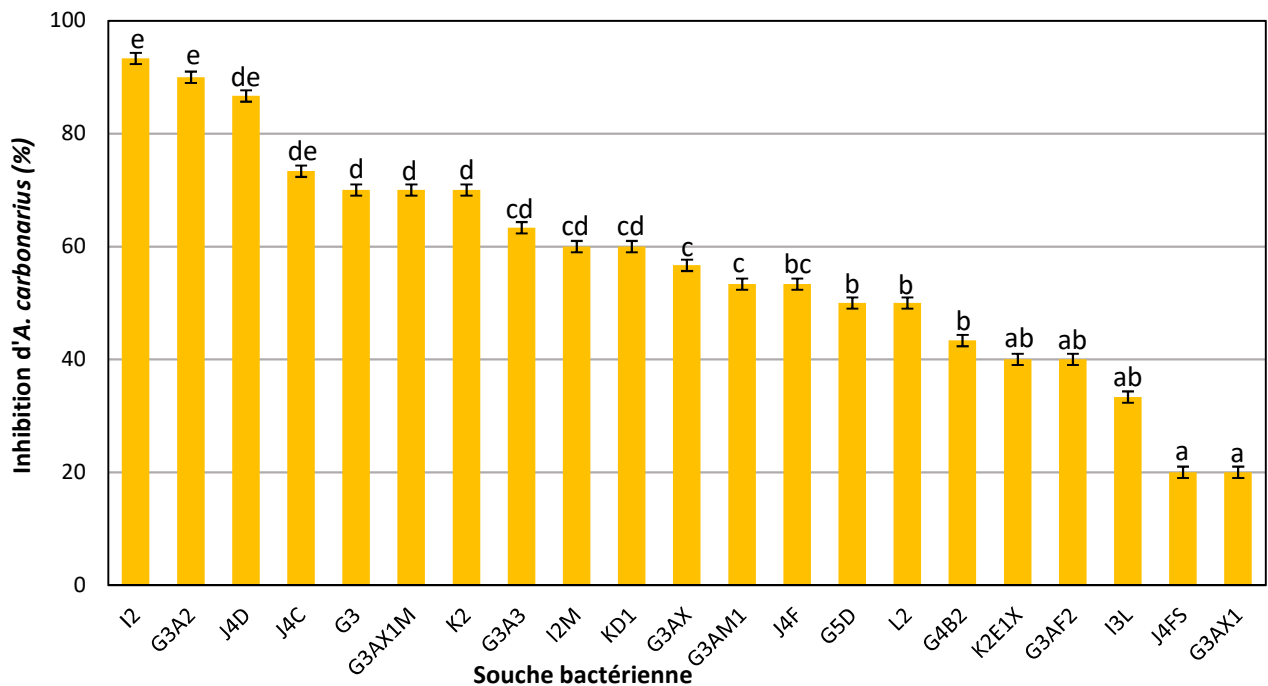


Figure 31. Effet des composés volatiles bactériens sur la croissance du champignon ochratoxinogène *Aspergillus carbonarius*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l’erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d’histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P>0.05$) d’après le test de Kruskal-Wallis.

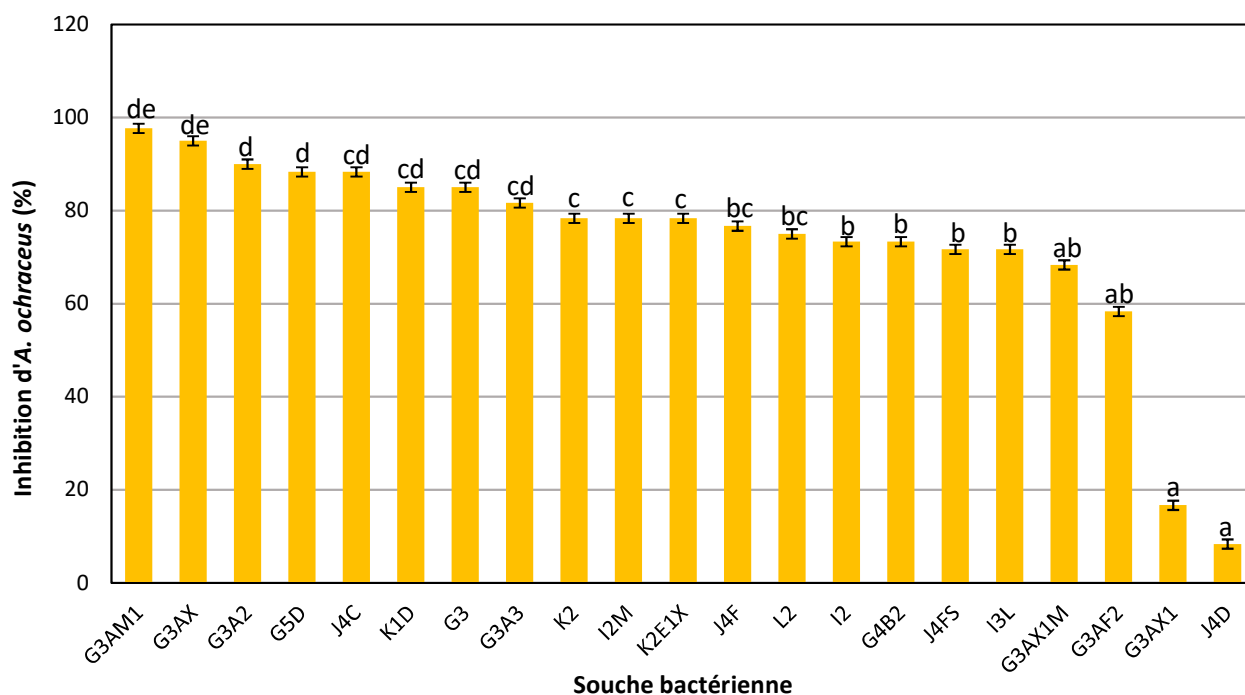


Figure 32. Effet des composés bactériens volatiles sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Aspergillus ochraceus*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différence significative ($P > 0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis.

2.1.2. Essais *in vivo* sur des baies de raisin

Les résultats des tests d'inhibition sur baies sont illustrés dans les Figures 33, 34 et 35. Les témoins non traités UC (baies inoculées avec l'agent pathogène uniquement) dans les deux essais biologiques ont montré des symptômes notables de pourriture d'*Aspergillus*. Dans l'essai biologique sur *A. carbonarius*, les taux de pourriture ont atteint 54% et 77% respectivement sur les baies non blessées et les baies blessées (données non présentées). Dans le bioessai sur *A. ochraceus*, la valeur de la sévérité globale de la pourriture avec les contrôles non traités (UC) a atteint 12% sur les fruits non blessés et 51% sur les baies blessées (données non présentées).

Dans les deux essais biologiques, les témoins UUC (baies non traitées non inoculées avec un agent pathogène) et MC (baies inoculées avec du milieu de culture stérile) ont été asymptomatiques pendant toute la période de l'incubation. Les témoins FC traités avec un fongicide (Fluazinam) appliqué à la dose recommandée, ont considérablement réduit les effets d'*A. carbonarius* et *A. ochraceus*, respectivement de 74% et 47% sur les baies blessées et de 54% et 12% sur les baies non blessées.

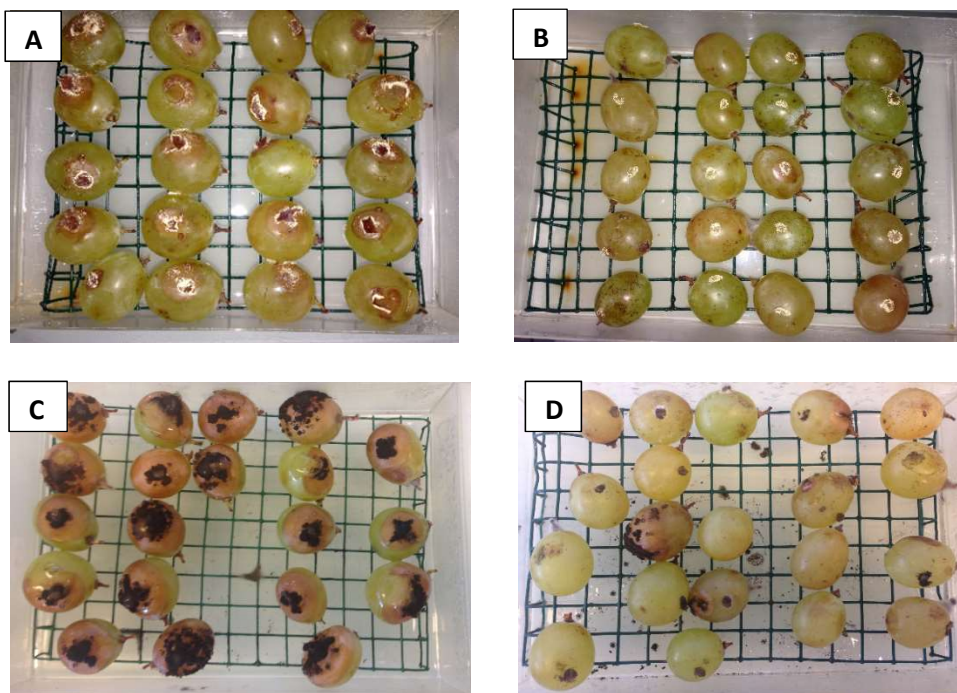


Figure 33. Baies de raisins blessées (A) (C) et non blessées (B) (D) après inoculation avec les bactéries antagonistes et l'agent pathogène, *i.e.* *Aspergillus ochraceus* (A) (B) et *Aspergillus carbonarius* (C) (D), après incubation à 28°C dans le noir pendant 24 h

2.1.2.1. Inhibition des altérations sur baies dues à *A. carbonarius* par l'action de souches bactériennes antagonistes

Les résultats des taux d'inhibition des altérations dues à *A. carbonarius* à la surface de baies de raisin obtenus avec les 21 souches bactériennes sont montrés dans la Figure 34. Sur les baies blessées, 20 souches sur les 21 testées ont protégé de manière significative les baies de raisin contre l'altération due à *A. carbonarius* en comparaison avec le témoin non traité (UC) inoculé avec l'agent pathogène uniquement. Les niveaux d'inhibition obtenus variaient de 10 à 77%, avec 5 souches bactériennes fortement antagonistes ayant eu des taux d'inhibition supérieurs à 70%. La valeur la plus élevée correspond à la souche *B. pumilus* G3AX. Sur les baies non blessées, seules 5 souches avaient des niveaux d'inhibition significatifs comparés au contrôle UC ($P > 0.05$) ; la valeur la plus élevée correspond à la souche antagoniste de *Bacillus sp.* G3AM1 (54%). Il est à noter qu'un prétraitement avec les deux souches K2E1X et G3AX1 a eu tendance à aggraver les symptômes de virulence d'*A. carbonarius* sur les fruits non blessés (non significatif à $P = 0,05$ par rapport à UC correspondant non traité).

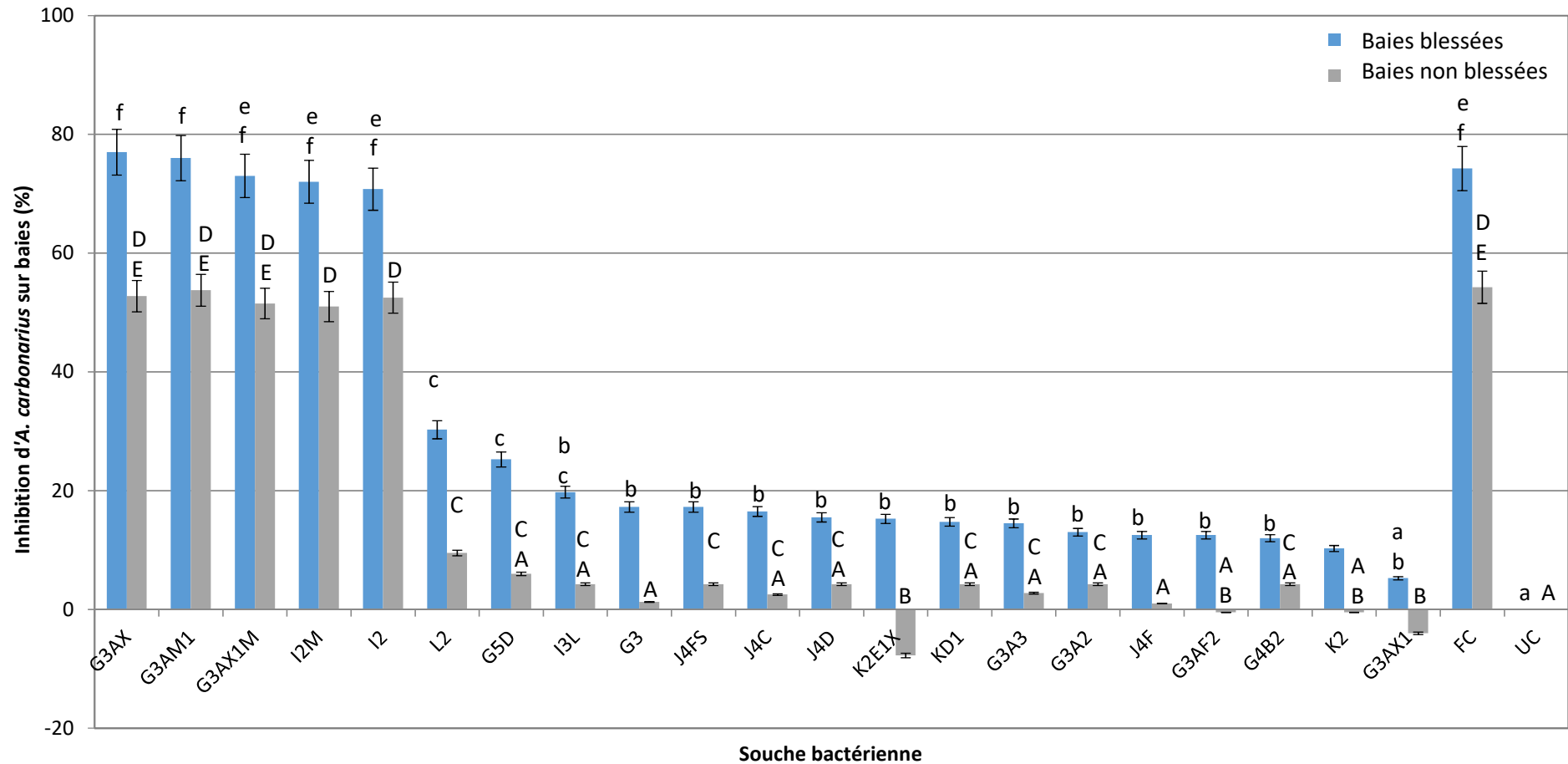


Figure 34. Effet des rhizobactéries sur le développement de la pourriture au champignon ochratoxigénique *Aspergillus carbonarius* sur des baies de raisin blessées (barres bleu) et non blessées (barres gris clair). Les valeurs moyennes (20 répétitions) partageant les mêmes lettres majuscules ou minuscules ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey après ANOVA à $p < 0.05$ (une ANOVA par type de baies, blessées ou non). UUC: Témoin non inoculé non traité, UC: Témoin non traité mais inoculé avec *A. carbonarius*, MC: Témoin milieu (LB stérile), FC: Témoin fongicide (Fluaziname).

2.1.2.2. Inhibition des altérations sur baies dues à *A. ochraceus* par l'action de souches bactériennes antagonistes

Les résultats concernant la réduction de la pourriture due à *A. ochraceus* sont présentés sur la Figure 35. Sur les baies de raisin blessées, seules 9 souches ont considérablement réduit le développement de la pourriture causée par *A. ochraceus* par rapport au témoin non traité (UC) inoculé avec l'agent pathogène uniquement. Les niveaux d'inhibition allaient de 22% à 50%, *Bacillus pumilus* G3AX étant la souche la plus efficace. Sur les baies non blessées, seules 5 des 21 souches testées ont réussi à réduire de manière significative les symptômes de la pourriture due à *A. ochraceus*. Le plus haut niveau d'inhibition était de 12%. Cinq souches (I3L, L2, G3AF2, J4C et J4F) ont eu tendance à augmenter l'effet virulent d'*A. ochraceus* sur les raisins non blessés (non significatif à $P = 0,05$ par rapport au contrôle UC non traité correspondant).

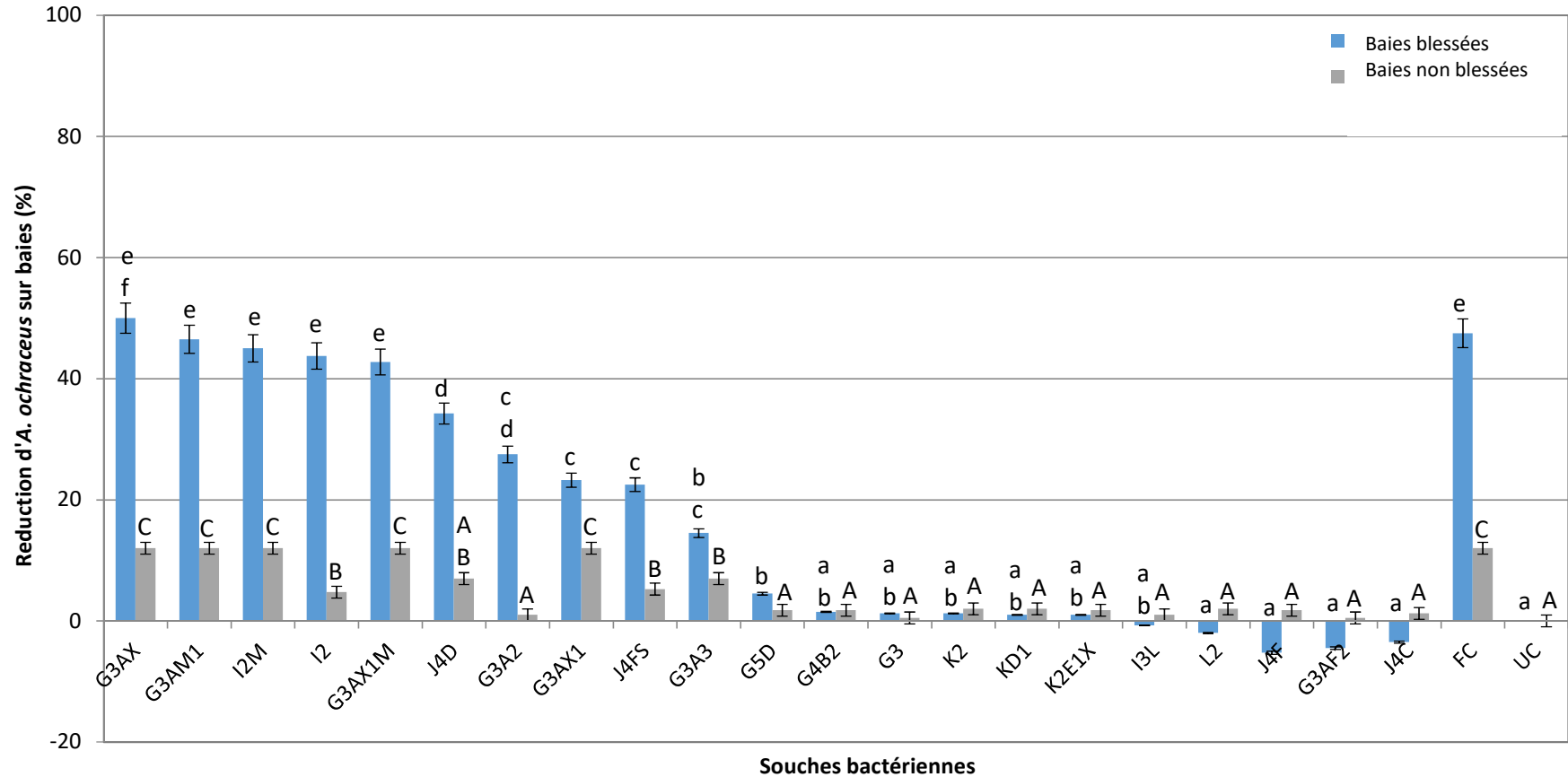


Figure 35. Effet des rhizobactéries sur le développement de la pourriture du champignon ochratoxinogène *Aspergillus ochraceus* sur des baies blessées (barres gris foncé) et non blessées (barres gris clair). Les valeurs moyennes (20 répétitions) partageant les mêmes lettres majuscules ou minuscules ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey après ANOVA à $p < 0.05$ (une ANOVA par type de baies, blessées ou non). UUC: Témoin non traité non inoculé avec l'agent pathogène, UC: Témoin non traité et inoculé avec *A. ochraceus*, MC: Témoin milieu (LB stérile), FC: Témoin fongicide (Fluaziname).

2.2. Essais de lutte biologique contre *P. verrucosum* *in vitro* et sur des pommes

2.2.1. Antagonisme bactérien *in vitro* contre une souche de *P. verrucosum* ochratoxinogène

L'inhibition de la croissance mycélienne de *P. verrucosum* a été mise en évidence par deux tests d'antagonismes *in vitro* (Fig. 36), afin de trouver des souches bactériennes antagonistes capables d'éliminer et /ou de réduire les maladies bleues des pommes causées par les *Penicillium*. Dans nos essais, 21 souches bactériennes ont été testées pour leurs effets inhibiteurs contre *P. verrucosum*, un champignon ochratoxinogène.

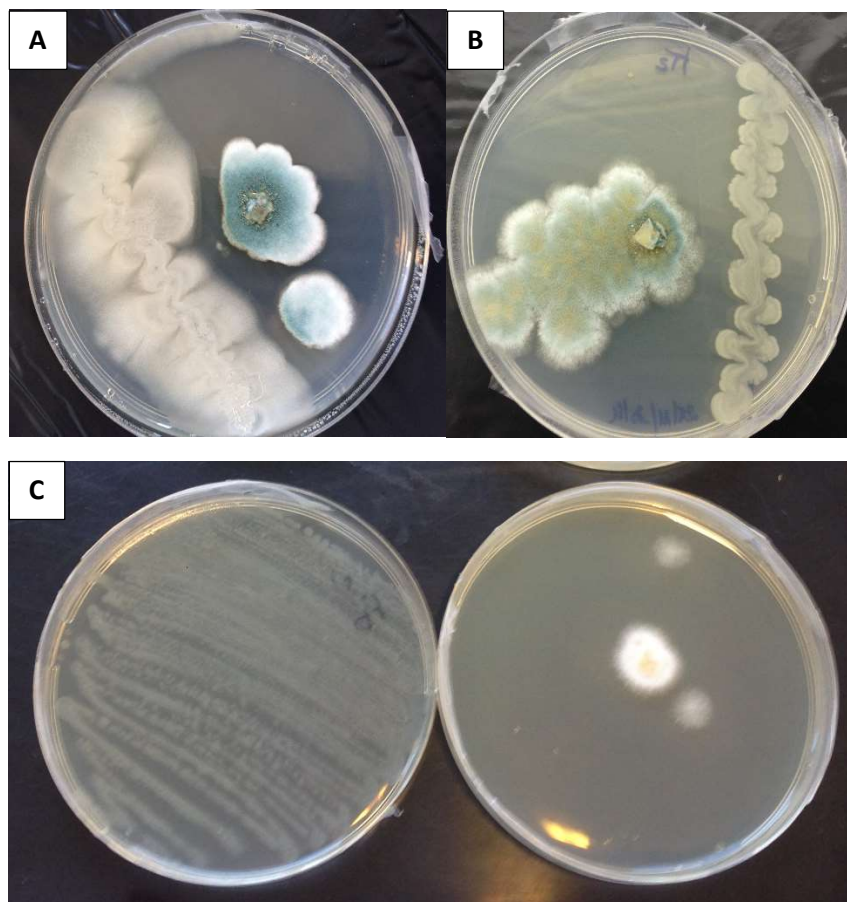


Figure 36. Antagonisme *in vitro* : Confrontation directe (A) (B) et Substances volatiles (C) contre *P. verrucosum* après incubation à 27°C à l'obscurité pendant 5 et 7 jours.

2.2.1.1. Confrontation directe

Les 21 souches antagonistes présentait des pourcentages d'inhibition variables pour la croissance de l'agent pathogène fongique testé de *P. verrucosum* ($P < 0.01$). Les taux d'inhibition variaient de 19% à 87% (Fig. 37). La souche antagoniste *Bacillus pumilus* G3AX s'est montrée la plus efficace avec une inhibition de la croissance fongique de 85%, suivie par

la souche *Bacillus sp.* G3AM1 (Fig. 30). Quatre autres souches ont montré une forte inhibition de la croissance fongique de plus de 60%, i.e. *B. velezensis* G3AX1M, *Microbacterium oxydans* G3AF2, *Brevibacterium frigoritolerans* KD1 et *Bacillus amyloliquefaciens* I2 (Fig. 37).

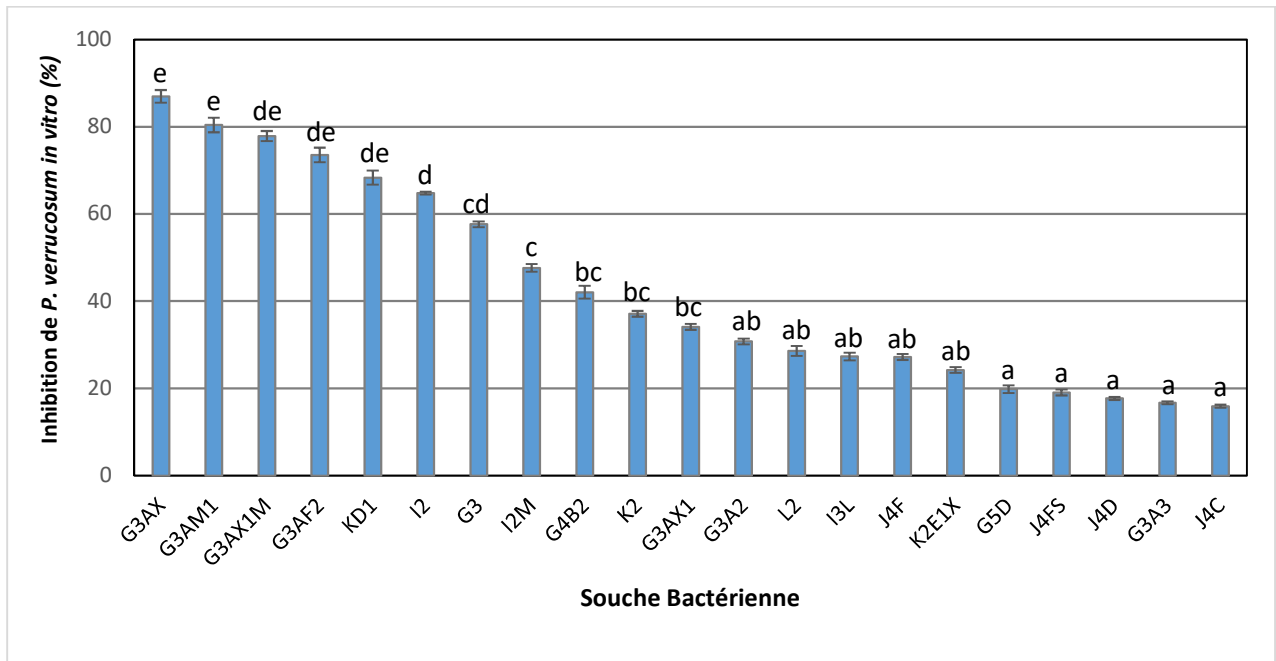


Figure 37. Effet des rhizobactéries sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Penicillium verrucosum*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives ($P > 0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis.

2.2.1.2. Substances bactériennes volatiles

Les 21 isolats bactériens testés ont montré une forte capacité à inhiber la croissance fongique de *P. verrucosum* grâce à l'émission de composés volatiles. Les pourcentages d'inhibition obtenus ont été très variables d'une souche à l'autre. La bactérie antagoniste la plus efficace était *Bacillus pumilus* G3AX avec un taux d'inhibition de 87% suivie par *Bacillus sp.* G3AM1 (Fig. 38).

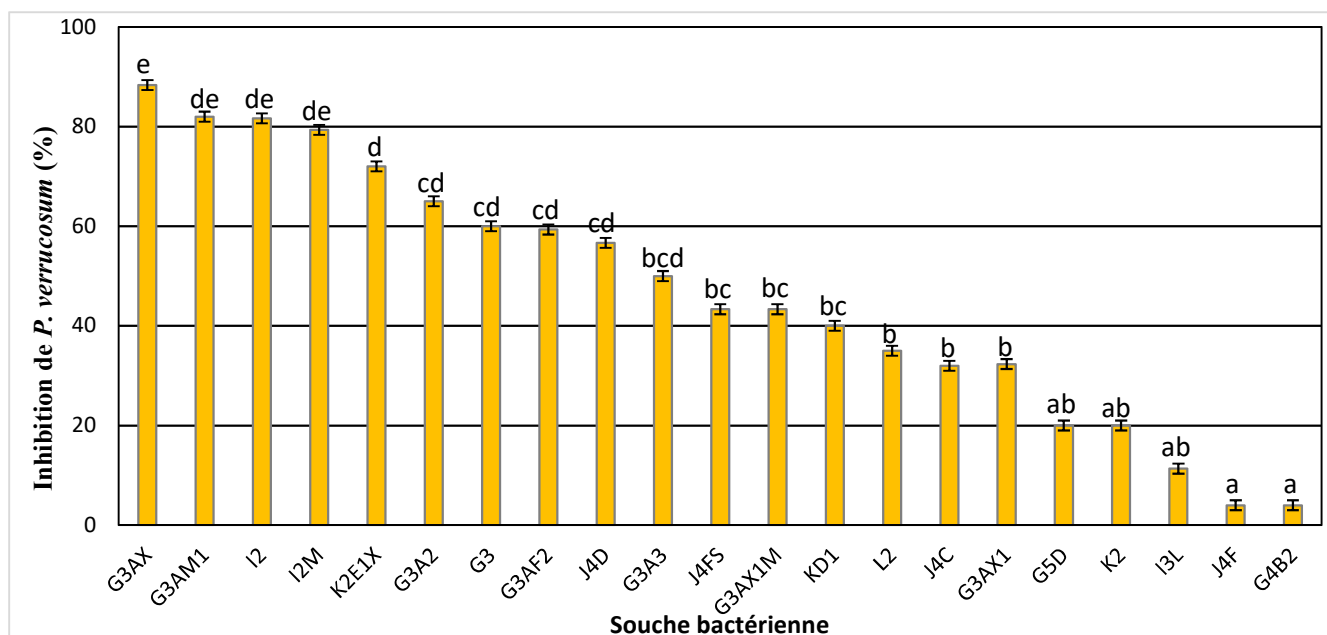


Figure 38. Effet des composés bactériens volatils sur la croissance du champignon ochratoxigénique *Penicillium verrucosum*. Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives ($P > 0.05$) d'après le test de Kruskal-Wallis.

2.3. Essai de lutte contre *P. verrucosum* sur pommes

Les résultats de ce bioessai sont présentés sur la Figure 40. En comparaison avec le témoin négatif non traité et inoculé avec l'agent pathogène uniquement (UC) (Fig. 39), toutes les souches ont réussi à protéger les pommes contre l'attaque de *P. verrucosum* mais avec des taux d'inhibition variables. Les valeurs obtenues étaient comprises entre 16% et 87%. La souche la plus efficace était *Bacillus pumilus* G3AX, suivie par *Bacillus sp.* G3AM1. Cependant, au total, seules quatre souches ont montré des taux d'inhibition supérieurs à 60% (significatifs comparés au contrôle UC à $P > 0.05$) (Fig. 40).

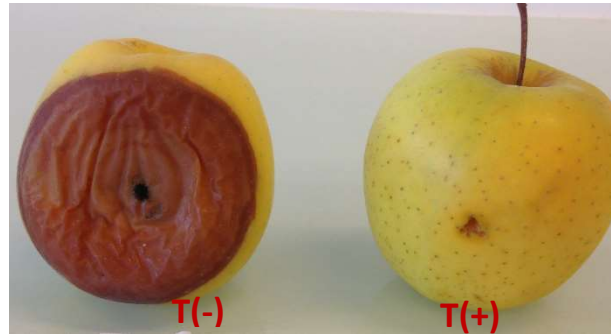


Figure 39. Essai de protection des pommes contre le champignon ochratoxinogène *P. verrucosum*. (A) UC : Témoin négatif (pomme inoculée avec le champignon seulement), UUC : Témoin positif, non traité et non inoculé ; (B) Pommes inoculées avec *P. verrucosum* et G3AX après incubation pendant 10 jours à 26°C.

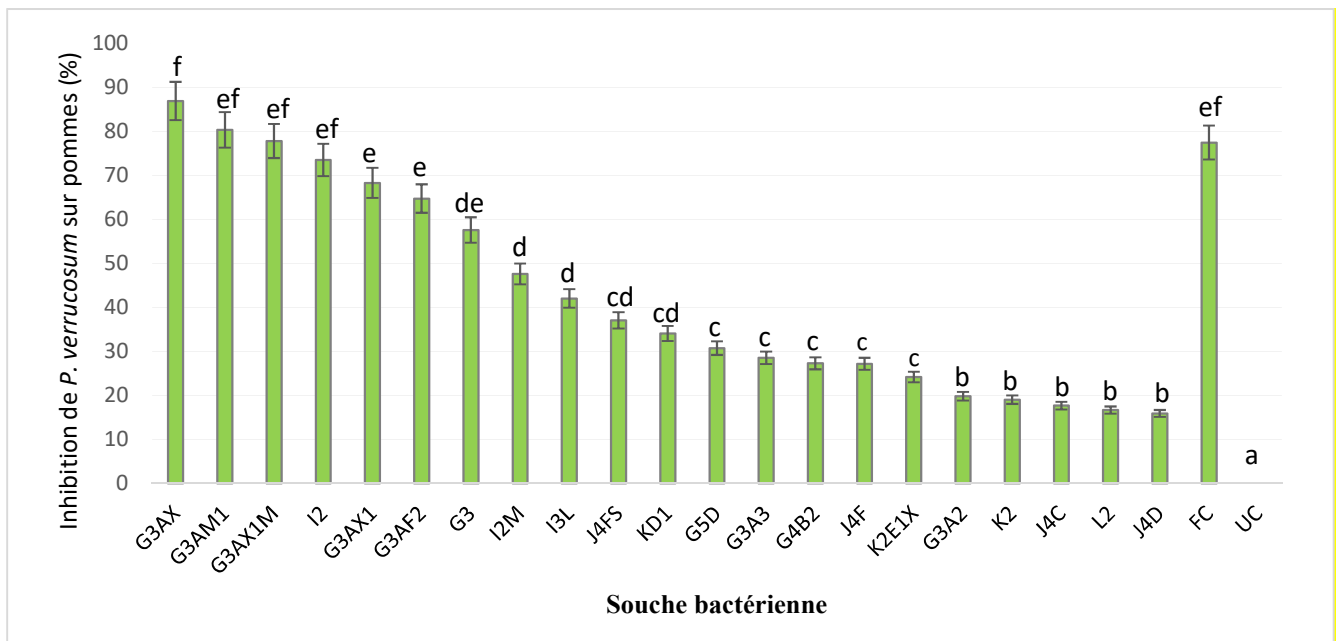


Figure 40. Effet des rhizobactéries sur le développement de la pourriture au champignon ochratoxinogène *Penicillium verrucosum* sur les pommes. Les valeurs moyennes (3 répétitions) partageant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey après ANOVA à $p < 0.05$. UUC: Témoin non traité et non inoculé, UC: Témoin non traité (inoculé avec *P. verrucosum*), MC: Témoin milieu (LB stérile), FC: Témoin fongicide (Fluaziname).

3. Discussion

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'efficacité de 21 rhizobactéries possédant des propriétés d'agents de biocontrôle (*i.e.* antagonistes d'agents pathogènes) afin de réduire la formation de pourritures dans les fruits (baies de raisin et pommes) causées par trois agents pathogènes ochratoxinogènes producteurs d'OTA, *i.e.* *A. carbonarius*, *A. ochraceus* et *A. carbonarius*.

La première partie de ce chapitre est consacrée aux essais de lutte contre les deux souches d'*Aspergillus* sur les baies de raisins afin de trouver des souches antagonistes capables de réduire et/ou d'éliminer ces moisissures ochratoxinogènes et d'apporter une meilleure protection biologique aux fruits.

En effet, dans les tests de confrontation directs, les plus grandes zones d'inhibition d'*A. carbonarius* et *A. ochraceus* ont été respectivement obtenues avec la souche G3AX appartenant à l'espèce *B. pumilus* (81% d'inhibition) et la souche I2 de *B. amyloliquefaciens* (inhibition de 85%). Des résultats similaires ont été observés concernant l'inhibition de différents agents pathogènes par les souches de *Bacillus in vitro* et *in vivo* (Gordillo *et al.*, 2009; Haidar *et al.*, 2016; Rezgui *et al.*, 2016). Des études antérieures ont signalé que les espèces de *B. pumilus* et *B. amyloliquefaciens* ont réussi à contrôler les *Fusarium* sur les tomates et avaient un effet bénéfique sur la croissance des plantes (Heidarzadeh et Ravari, 2015). Dans d'autres études, ces deux espèces avaient un effet inhibiteur sur la moniliose, une pourriture causée par *Erwinia carotovora* et *Monilinia fructicola* sur les légumes et les fruits à noyau (Liu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013).

De plus, il a été démontré que les espèces appartenant aux genres *Bacillus* et *Paenibacillus* présentent des activités antibactériennes et/ou antifongiques par l'émission de composés organiques volatils (COV) (Berrada *et al.*, 2012; Cernava, 2012; Rybakova *et al.*, 2015). Plusieurs COV peuvent réduire la croissance des champignons, altèrent les spores et les hyphes fongiques et/ou favorisent la croissance des plantes (Kai *et al.*, 2007; Weisskopf, 2013). Dans notre étude, toutes les souches bactériennes testées produisaient des substances organiques volatiles : les inhibitions mycéliennes les plus importantes ont été observées avec la souche I2 de *B. amyloliquefaciens* et la souche G3AM1 de *Bacillus sp.*, respectivement contre *A. carbonarius* (93% d'inhibition) et *A. ochraceus* (97% d'inhibition).

La pourriture des baies, connue sous le nom de pourriture à *Aspergillus* ou pourriture noire, est causée par les *Aspergillus* dont la présence est très courante dans les vignobles (Bejaoui *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2006; Tsitsigiannis *et al.*, 2012). Pour observer directement l'effet

antagoniste des 21 souches bactériennes sur ces agents pathogènes ochratoxinogènes, nous avons mené des expériences sur des baies de raisin blessées et non blessées. Ces tests comparatifs de dépistage *in vitro* ont montré de nettes différences d'efficacité des souches bactériennes contre les deux agents pathogènes fongiques, *i.e.* *A. carbonarius* et *A. ochraceus*. Ces différences dépendaient de l'agent pathogène considéré et de la présence ou de l'absence de plaies à la surface du fruit.

Dans nos biotests, les résultats de pathogénicité étaient positifs à 100% dans les deux cas ; toutes les baies, blessées ou non blessées, ont développé des symptômes de pourriture. Cependant, la sévérité globale de la pourriture était plus faible lorsque les baies étaient non blessées et inoculées par *A. ochraceus*. Le degré de virulence d'*A. carbonarius* était de 77% sur les baies blessées et de 54% sur les baies non blessées. La virulence d'*A. ochraceus*, était inférieure, 51% et 12% respectivement pour les baies blessées et les baies non blessées. De telles différences dans le degré d'infection entre les baies blessées et les baies non blessées, pourraient être expliquées par le fait que les *Aspergillus spp.* infectent les baies de raisin à travers des blessures. Ceci confirme le rapport d'Onivins (2005) montrant que les baies crevées par l'approvisionnement en eau après une période sèche, ainsi que par des blessures causées par les insectes, les oiseaux, la grêle, la déshydratation de la tige ou la maturité avancée, sont des facteurs très favorables au développement de champignons pathogènes. Les blessures des baies peuvent également fournir des nutriments qui sont probablement nécessaires aux champignons phytopathogènes pour initier le processus pathogène (Haidar *et al.*, 2016; Onivins, 2005).

Sur les baies blessées, 5 souches ont fourni des niveaux importants de protection contre la croissance mycélienne, supérieurs à 70% pour *A. carbonarius* et 42% pour *A. ochraceus*. Ces souches antagonistes sont *B. pumilus* (G3AX), *Bacillus sp.* (G3AM1), *B. velezensis* (G3AX1M et I2M), et *B. amyloliquefaciens* (I2). Sur les baies non blessées, ces mêmes cinq souches ont révélé des niveaux d'inhibition légèrement plus bas pour *A. carbonarius*, mais avec *A. ochraceus* leur effet inhibiteur n'a pas dépassé les 12%. Comme pour les processus pathogènes fongiques nécessitant probablement des nutriments spécifiques, les différences de disponibilité des nutriments entre les baies de raisin blessées et non blessées pourraient être le principal facteur à l'origine des différences de l'effet antagoniste des souches bactériennes testées. Malgré ces différences de niveau d'inhibition, ces essais biologiques ont confirmé l'efficacité des souches de *Bacillus* sur les champignons pathogènes sur différentes plantes hôtes

(Heidarzadeh et Ravari, 2015; Mardanovna *et al.*, 2017; Palazzini *et al.*, 2016; Pantelides *et al.*, 2015; Tsitsigiannis *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012).

Dans nos essais biologiques, en présence des souches bactériennes, l'incidence de la maladie était nulle et/ou les lésions induites par les deux *Aspergillus* pathogènes disparaissaient, ou étaient réduites même si les effets antagonistes étaient différents selon le champignon ochratoxigénique considéré. À titre d'exemple, la souche L2 de *B. amyloliquefaciens* a réduit la croissance mycélienne d'*A. Carbonarius* de 30% mais elle a augmenté la virulence d'*A. ochraceus* de 2% sur les baies blessées. De plus, nous avons observé pour la première fois que deux souches, *i.e.* *Bacillus sp.* (K2E1X) et *B. velezensis* (G3AX1), ont augmenté la virulence d'*A. carbonarius* sur des baies de raisin non blessées, alors que cinq souches, *i.e.* *Paenibacillus sp.* I3L, *B. amyloliquefaciens* (L2 et J4C), *B. thuringiensis* (J4F) et *Microbacterium oxydans* (G3AF2), ont augmenté la virulence d'*A. ochraceus* sur les baies blessées. Haidar *et al.* (2016) ont observé des phénomènes similaires avec des souches de *B. pumilus* et *Xanthomonas sp.* dans des essais de biocontrôle de *Botrytis cinerea* sur baies.

Conformément aux tests *in vitro*, *i.e.* les confrontations directes et les substances volatiles, la souche G3AX de *B. pumilus* était la souche la plus efficace pour contrôler les deux *Aspergillus* ochratoxinogènes. La même souche a réduit les niveaux d'expression de la pourriture de 77% et 53% pour *A. carbonarius* et de 50% et 12% pour *A. ochraceus*, respectivement sur baies blessées et non blessées.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, notre étude visait la recherche de meilleurs antagonistes bactériens, contre la croissance de *Penicillium verrucosum*, agent responsable de la pourriture bleue des pommes et de leur contamination par les OTA. Pour les essais menés *in vitro*, *i.e.* confrontations directes et émission de substances volatiles, les résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'essai de lutte sur les raisins et mettent en évidence le succès des isolats bactériens à lutter contre les moisissures fongiques. Ces résultats confirment la capacité inhibitrice de la souche G3AX de *B. pumilus* que ce soit au niveau des confrontations directs ou au niveau de l'émission de substances volatiles. Il est important de noter que la souche G3AM1 de *Bacillus sp.* avait des capacités inhibitrices très proches de celles observées avec G3AX. Ces deux espèces de *Bacillus* ont inhibé à la fois les *Aspergillus* et les *Penicillium*. Ceci est en accord avec plusieurs études qui ont prouvé que les bactéries du genre *Bacillus* sont des agents de biocontrol efficaces contre plusieurs espèces fongiques. De nombreuses souches du genre *Bacillus*, ont montré une activité antifongique significative (Yu *et al.*, 2002; Dimkic *et al.*, 2013; Dimkic *et al.*, 2015). En effet, les *Bacillus* sont capables de produire une grande variété de

métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne, la source principale de leur potentiel antagoniste contre les agents pathogènes dans les tissus végétaux (Rückert *et al.*, 2011).

Dans les bioessais *in vivo*, réalisés sur les pommes, des niveaux de protection variables en fonction des souches antagonistes testées ont été observés. La souche G3AX de *Bacillus pumilus* a, encore une fois, démontré son efficacité antagoniste contre le champignon toxigène *P. verrucosum*. Il a en effet déjà été prouvé que les métabolites antifongiques produits par *Bacillus pumilus* inhibent la croissance mycélienne de nombreuses espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Munimbazi et Bullerman, 1998).

4. Conclusion

En conclusion, notre étude a montré que la souche G3AX de *B. pumilus* a un grand potentiel en tant qu'agent de biocontrôle contre les maladies à *Aspergillus* sur la vigne et les pourritures bleues causées par *P. verrucosum* sur les pommes. Des recherches supplémentaires devraient être menées dans les vignobles et sur les pommiers pour tester la capacité de cette souche, mais également celle d'autres bactéries isolées qui ont une excellente activité antagoniste (*Bacillus sp.* G3AM1 et *Bacillus velezensis* I2M), de contrôler les pourritures causées par *A. carbonarius*, *A. ochraceus* et *P. verrucosum*.

Il est important de noter que certaines bactéries se sont montrées efficaces contre un agent pathogène tout en améliorant le développement d'un autre. De telles souches ne devraient donc pas être utilisées comme agents de biocontrôle sur le terrain en raison de leur capacité à stimuler d'autres maladies que celle ciblée.

Les meilleurs résultats de protection sur les baies de raisin ont été obtenus lorsque les fruits ont été immergés dans une culture liquide des bactéries antagonistes, ce qui suggère que ces souches pourraient être utiles comme un traitement de surface avant et/ou pendant la période de stockage du raisin et des pommes pour empêcher la formation de pourriture causée par des moisissures toxigènes sur les fruits.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'ochratoxine A (OTA) est un métabolite secondaire produit par de nombreuses espèces de champignons filamenteux contaminant les aliments, tels que *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus niger*. L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (AIRC) a classé l'OTA comme « cancérogène possible pour l'homme (groupe 2B) ». Cette mycotoxine a été trouvée principalement dans les aliments dérivés de plantes. En raison de cette constatation, de nombreux pays ont établi des seuils limites d'OTA dans les aliments. Les valeurs limites de l'OTA dans les fruits et les légumes vont de 10 à 50 µg/kg avec 10 mg/kg comme limite maximale établie (Van egmond *et al.*, 2008; Solfizzo 2010). Par ailleurs, il est à noter que des teneurs maximales spécifiques aux pommes n'ont pas encore été établies.

Par conséquent, les champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* posent de graves problèmes phytopathologiques ainsi que des risques de contaminations à l'OTA aux stades de pré- et de post-récolte, ainsi que dans les produits alimentaires transformés. Les principales maladies des plantes causées par ces moisissures toxigènes sont la pourriture noire des raisins (causée par *Aspergillus spp.*) et les pourritures bleues des pommes (causée par *Penicillium spp.*) (Yahia *et al.*, 2009). Les *Penicillium spp.* sont la source principale de contamination des produits alimentaires stockés dans les climats tempérés par l'OTA (Yahia, 2009), tandis qu'*Aspergillus spp.* dominant dans les pays aux climats chauds (El khouey et Atoui, 2010) ce qui explique leur présence en Méditerranée surtout avec le réchauffement climatique de ces dernières années (Tsitsigiannis *et al.*, 2010). Trouver des moyens pour inhiber la croissance de ces champignons est donc important pour réduire la contamination des aliments en OTA.

Les méthodes de luttés utilisées contre ces parasites sont principalement de nature chimique. De nos jours, l'utilisation systématique de produits chimiques, notamment les pesticides, en viticulture et dans le monde agricole en général, est remise en question suite à la conscience des risques qu'ils génèrent pour l'environnement et la santé humaine (Haidar *et al.*, 2016). La recherche d'une alternative de lutte permettant, d'une part, de réduire les dégâts dus aux maladies de post-récolte et, d'autre part, de répondre aux contraintes imposées par le marché international, est devenue une des priorités de ce secteur. Par ailleurs, l'utilisation d'agents de biocontrôle devient une alternative aux produits chimiques de plus en plus importante. C'est dans ce contexte que cette thèse avait pour principal objectif de trouver des agents de lutte efficaces capables de protéger les fruits des attaques fongiques causées par les champignons toxigènes afin d'éliminer l'OTA.

Afin de mieux connaître les champignons toxigènes, la première partie de notre travail a été consacré à l'identification et à la caractérisation de souches (i) d'*Aspergillus* et (ii) de *Penicillium*.

(i) Une collection de souches d'*Aspergillus* spp. a été isolée à partir de deux variétés de raisins, *i.e.* Muscat d'Italie et Red Globe. L'identification moléculaire par amplification et séquençage des régions ITS des 87 isolats fongiques a permis d'assigner quatre espèces : *Aspergillus carbonarius* (58 souches), *Aspergillus niger* (17 souches), *Aspergillus flavus* (6 souches) et *Aspergillus ochraceus* (6 souches). On remarque la dominance de l'espèce *A. carbonarius*, ce qui est expliqué par le fait que c'est le principal contaminant des raisins.

L'étude du pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* spp. a révélé que 17 d'entre elles secrétaient de l'ochratoxine A avec en quantités variables. Toutes les souches productrices appartenaient aux deux espèces *A. carbonarius* et *A. ochraceus*, avec une majorité d'*A. carbonarius*.

La plupart des *Aspergillus carbonarius* ochratoxinogènes ont été collectés dans la région de Zaghouan, uniquement sept souches provenaient de la région de Mornag. La variété Red Globe est la variété la plus attaquée par les *Aspergillus* ochratoxinogène. Elle a été nouvellement introduite en Tunisie et pourrait donc être une source importante de contamination par l'OTA.

(ii) Quinze souches de *Penicillium* ont été isolées à partir de pommes provenant de la région de Sbiba en Tunisie. L'identification moléculaire a permis de les classer en 5 espèces dont la plus dominante était *P. expansum*. Trois souches étaient productrices d'OTA, la valeur la plus élevée était celle de la souche P8 de *P. verrucosum*. Ce dernier est reconnu comme étant le principal producteur d'OTA à côté des *Aspergillus*.

Trois souches fongiques ochratoxinogènes, *i.e.* *Aspergillus carbonarius* (ASP31), *Aspergillus ochraceus* (ASP73) et *Penicillium verrucosum* ont été sélectionnées en fonction de leur potentiel de production des ochratoxines A.

Dans une deuxième partie, nous avons recherché des agents antagonistes contre les agents pathogènes ochratoxinogènes. Pour cela, nous avons procédé à l'isolement (à partir de la rhizosphère de sols de vignobles tunisiens) et à l'identification moléculaire de 39 souches bactériennes par les gènes codant l'ADNr 16S et la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*). La capacité de ces souches à exprimer des traits antagonistes a été recherchée. Les expérimentations ont consisté à sélectionner des souches qui (i) possédaient des gènes codant

pour des antibiotiques, *i.e.* fengycines A, B, D et E et une bacillomycine, ayant, selon la littérature, des propriétés fongitoxiques (Koumoutsi *et al.*, 2004; Jourdan *et al.*, 2009) ; (ii) qui produisaient des sidérophores et (iii) qui solubilisait le phosphate. Ces expérimentations ont permis de choisir des agents de biocontrôle potentiels contre les *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. verrucosum*. Un total de 21 souches antagonistes a été sélectionné, la plupart appartenant au genre *Bacillus*.

Dans la troisième partie, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont été menées afin d'inhiber la croissance mycélienne des trois espèces fongiques repertoriées ci-avant. Toutes les souches se sont montrées capables d'inhiber les pathogènes fongiques. La souche G3AX de *Bacillus pumilus* a réussi, dans tous les essais de confrontations directes et de production de composés volatiles, à inhiber la croissance mycélienne des trois champignons ochratoxinogènes. Une autre souche, G3AM1 de *Bacillus sp.*, avait des effets antagonistes très proches de G3AX. L'originalité de notre expérimentation tient au fait du choix de l'antagoniste biologique à appliquer, du fruit à traiter, mais aussi au comportement des pathogènes sur les baies blessées et non blessées.

En ce qui concerne les résultats du criblage sur baies, il est important de noter qu'on a observé une croissance fongique non seulement sur les baies blessées mais également sur la surface des baies non blessées, où, habituellement, le champignon commence à se développer. On constate donc que les agrégats d'*Aspergillus spp.* peuvent pénétrer dans les baies même sans dommages à la surface du fruit ce qui élimine l'hypothèse que ces champignons rentrent à travers des blessures.

Une hétérogénéité de protection contre *A. carbonarius* et *A. ochraceus* a été trouvée, ainsi qu'en fonction des baies, blessées ou non blessées. Cette hétérogénéité peut être expliquée par une différence importante dans la quantité d'éléments nutritifs présents en fonction du type de baies. Les souches les plus inhibitrices du pathogène sur les baies, étaient *B. pumilus* (G3AX1), *Bacillus sp.* (G3AM1), *B. amyloliquefacien* (I2) et *B. valenzis* (G3AX1M et I2M).

Une protection était bien visible dans le cas de l'inoculation des pommes avec les bactéries testées et *P. verrucosum*. Une fois encore, G3AX a conféré la meilleure protection, cette fois, contre la pourriture bleue des pommes. Il est important de noter que toutes les souches ont inhibé la croissance mycélienne de *P. verrucosum*. Contrairement à ce qui a été observé sur les baies de raisins, aucune bactérie n'a aggravé l'effet pathogène du champignon.

Ainsi, nos résultats indiquent que le niveau d'efficacité de la protection par des bactéries sur différents hôtes, *i.e.* baies et pommes, contre les différents pathogènes testés, *i.e.* *A. carbonarius*, *A. ochraceus* et *P. verrucosum*, dépend significativement :

- i) de la souche bactérienne antagoniste,
- ii) de l'espèce du pathogène fongique, donc de l'association "souche/pathogène",
- iii) du génotype au sein d'une espèce de pathogène (*ochraceus*, *carbonarius*),
- iv) du produit végétal hôte testé (baie, pomme) et de l'état de ce dernier (baie blessée ou non blessée).

Pour la poursuite de ce travail, plusieurs pistes d'études et d'applications sont envisageables :

Au niveau des perspectives :

Cette étude n'ayant pu déterminer la raison pour laquelle la variété Red Globe était plus sensible aux souches ochratoxinogènes que les autres variétés, des études ultérieures pourraient être effectuées afin de mieux comprendre la relation entre les caractéristiques de la variété de raisin de table et la sensibilité à la maladie.

Bien que l'objectif des recherches actuelles ne comprend pas l'évaluation des mycotoxines, il est important de prendre en compte la détermination quantitative des mycotoxines afin de tester la capacité de souches microbiennes sélectionnées à inhiber directement l'ochratoxine A dosée avec la méthode HPLC.

Afin de compléter notre étude, il serait intéressant d'étudier le mode d'action des bactéries sélectionnées, comme l'effet qu'elles exercent sur la plante, *e.g.* l'induction de la résistance systémique du végétal, ou sur les autres micro-organismes, *e.g.* la compétition pour les nutriments, l'espace ou l'antibiose en post-récolte lors de la conservation des fruits.

Un autre résultat intéressant et novateur a été de montrer que, dans nos conditions expérimentales, l'association de certaines souches bactériennes avec *Aspergillus* sur les baies de raisins, telles que *Bacillus sp.* (K2E1X) et *B. velezensis* (G3AX1), tendait à augmenter les symptômes de maladie. En revanche, ce phénomène n'a pas été observé suite à l'inoculation avec *P. verrucosum*. Des études complémentaires sont donc indispensables pour comprendre le potentiel effet synergique de ces souches dans le développement des symptômes des maladies des fruits.

Un point important pour un agent de biocontrôle est de connaître sa capacité à coloniser et à persister sur la plante qu'il est censé protéger. Les souches seront donc inoculées au vignoble

et sur pommiers, afin d'apprécier leur aptitude à persister et à protéger les fruits dans les conditions environnementales réelles.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abarca, M. L. B., Castella, M.R., Cabanes, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2650-2652.
- Abarca, L. M., Accensi, F., Cano, J., Cabanes, J. F. 2004. Taxonomy of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86, 33-49.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa). 2009.
- Agricultural Statistics Analysis (ASA), 2016. Ministry of Agriculture, Republic of Tunisia.
- Aksoy, U., Eltem, R., Meyvaci, K.B., Altindisli, A., Karabat, S., 2007. Five-year survey of ochratoxin A in processed sultanas from Turkey. *Food Addit. Contam.* 24, 292-296. <https://doi.org/10.1080/02652030601039021>.
- Allam, N.G., El-Shanshoury, A.E.R.R., Emara, H.A., Zaky, A.Z., 2011. Biological activity of *Streptomyces noursei* against ochratoxin A producing *Aspergillus niger*. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 666-677. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2133>.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E., 2011. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112, 159-174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>.
- Association Générations Futures (AGF) 2012.
- Atoui, A., Dao, H.P., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2006. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molucular Nutrition & Food Research*. 50, 488-493. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500165>.
- AOAC Official method 2000. 09 Ochratoxin A in Roasted Coffe. Immunoaffinity Column HPLC Method First Action 2000. AOAC International 2002.
- Ayoub F, Reverberi M, Ricelli A, D'Onghia AM, Yaseen T., 2010. Early detection Of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on table grapes: a tool for quality improvement. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 9, 1285-93. doi: 10.1080/19440049.489576.
- Azemar, B., 2000. Etude du rôle de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanisme moléculaire impliqué.- Thèse universitaire, Toulouse.
- Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. In: Logrieco, A., Bailey, J.A., Corazza, L., Cooke, B.M. (eds.), *Mycotoxins in Plant Disease*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0001-7_5.
- Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z. and Magan, N., 2006a. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International journal of food microbiology*, 111, S72-S82.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiol. Letters*. 255, 203-208. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00073.x>.

- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2004. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography A*. 1054, 397-401.
- Blum L.E.B., do Amarante C.V.T., Dezanet A., 2007. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'fuji' e 'gala' *Rev Bras Frutic.* 29, 265-268.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): The potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1044-1051. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>.
- Bennett, J. W. and KLICH, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- Berrada, I., Benkhemmar, O., Swings, J., Bendaou, N., Amar, M., 2012. Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 625-630. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/43872349>.
- Boermans, H. J. and Leung, M. C., 2007. Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. *International journal of food microbiology*, 119, 95-102.
- Boudra, H., 2002. La contamination par les moisissures et les mycotoxines des fourrages conservés signification et prévention. *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*, 60-62.
- Bredenkamp, M. W., Dillen, J. L., Van Rooyen, P. H. and Steyn, P. S., 1989. Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: Probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.* 2, 1835-1839.
- Bressan, W., 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *Biocontrol.* 48, 233-240. <https://doi.org/10.1023/A:1022673226324>.
- Broydé H, Thierry D., 2013. Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus* spp.. *Cahiers d'agriculture.* 22 (3), 182-194.
- Bryden, W. L., 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* 16, 95-101.
- Bau, M., Bragulat, M., Abarca, M., Mínguez, S., & Cabañes, F., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 125-130.
- Budavari, S., O'neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., 1989. The Merck Index, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, 1008
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Mínguez, S. and Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *International journal of food microbiology*, 79, 213-215.
- Castella, G., Bragulat, M.R., Puig, L., Sanseverino, W., Cabañes, F.J., 2018. Genomic diversity in ochratoxigenic and non ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius*. *Scientific Reports.* 8:5439 DOI:10.1038/s41598-018-23802-8.
- Castellari, M., Fabbr, S., Fabiani, A., Amati, A., Galassi, S., 2000. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *Journal of Chromatography.* 888, 129-136.
- Chapon, J.F., Westercamp, P., 1996. Entreposage frigorifiques Give pommes et give poires. It take 2: conduite of the conservation. CTIFL, Paris.

- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., & Yu, Z., 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters*. 30(5), 919-923.
- Chen, Y., Li, B., Zhang, Z., Tian, S., 2017. Pathogenicity Assay of *Penicillium expansum* on Apple Fruits. *BioProtocol*. 7 (09) 2264. DOI:10.21769/2264.
- Cernava, T., 2012. Identification of volatile organic compounds from plant-associated bacteria. Master Thesis. Graz University of Technology.
- Chiotta, M., Ponsone, M., Combina, M., Torres, A., & Chulze, S., 2009. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 136(1), 137-141.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* 164, 493-513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>.
- Ciegler, A., Fennell, D., Mintzlaff, H.-J., Leistner, L., 1972. Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften*. 59, 365-366.
- Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Scuderi, G., Scortichini M., 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *J. Phytopathol.* 153, 654-666. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01033.x>.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H., Sessitsch, A., 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* 62, 188-197. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2003.
- Da Rocha Rosa. C.A., Combina. M., Palacios. V, Fraga. M.E., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentine and Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 19(4), 408.
- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna, B., Bompeix, G., 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wines. *Food control*. 14, 225-227.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2008. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* 94, 2667-2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.
- Demirel, M. C. Booij, M. J. Hoekstra A. Y., 2013. Impacts of climate change on the seasonality of low flows in 134 catchments in the River Rhine basin using an ensemble of bias-corrected regional climate simulations. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 17, 4241–4257.
- D'mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C., 1997.- Mycotoxins.- *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- Déniel, F., Rey, P., Chérif, M., Guillou, A., Tirilly, Y., 2004. Indigenous bacteria with antagonistic and plant-growth promoting activities improve slow-filtration efficiency in soilless culture. *Can. J. Microbiol.* 50, 499–508. <https://doi.org/10.1139/w04-034>.
- Dimkic, I., Zivkovic, S., Beric, T., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Stankovic, S., Fira, Dj., 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Control*. 65, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012>.

- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>.
- El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., Pfohl-Leszkowicz, A., 2006. Preliminary data on the presence of mycotoxins (Ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives" Greek style" of Moroccan origin. *Molecular Nutrition and Food Reseach.* 50, 507-512.
- Elaroussi, M., Mohamed, F., El Barkouky, E., Atta, A., Abdou, A., Hatab, M., 2006. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathology*, 35, 263-269.
- El Khoury A., Rizk T., Lteif R., Azouri H., Delia M.L. and Lebrihi A., 2006. Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin B1-Producing Fungi in Lebanese Grapes and Ochratoxin A Content in Musts and Finished Wines during 2004. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry.* 54 (23), 8977–8982.
- El Khoury, A. and Atoui, A., 2010. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins.* 2, 461-93.
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., Lebrihi, A., 2011 Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of Food Science.* 76 (4), 247-253.
- Agence de protection environnementale (EPA) 2012.
- European Commission, 2013. Commission Regulation (EU) No 212/2013 of 11 March 2013 replacing Annex I to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards additions and modifications with respect to the products covered by that Annex Text with EEA relevance. *Official J. Eur. Union.* 68, 30-52.
- Eskola, M. 2002. Study on trichothecenes, Zearalenone and Ochratoxin A in finnish Cereals : Occurrence and Analytical Techniques. Academic dissertation.
- Fachinello J.C., Nachtigall J.C., 2012. *Fruticultura – Fundamentos e Práticas*. Available from: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/fruticultura_fundamentos_pratica/11.4.htm[Accessed 12.02.13].
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A., Creppy, E.E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco : a preliminary survey. *Food and Additives Contaminant.* 18, 565-568.
- Fillinger, S., Walker, A.S., 2016. Chemical Control and Resistance Management of *Botrytis* Diseases. In: Fillinger, S., Elad, Y. (Eds.). *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems.* 189-216.
- Filofteia Diguta C., 2011. *Ecologie des moisissures présentes sur les baies de raisin.* Thèse de doctorat.
- Földes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., & Szigeti, J., 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology.* 89(5), 840-846.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>.
- Gaffoor, I. and Trail, F., 2006. Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and environmental microbiology*, 72, 1793-1799.

- Gallo, A., Knox, B. P., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Baker, S. E., Perrone, G., 2014. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International journal of food microbiology*. 179, (10) 7.
- Gardiner, D. M. and Howlett, B. J., 2005. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letter*. 248, 241-248.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole carbon-source-utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351-2359.
- Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B., Turesky, R.J., 01. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radic Biol Med.* 30, 1089-1098.
- Gerin, D., González-Candelas, L., Ballester, AR., Pollastro, S., De Miccolis Angelini, RM., Faretra, F., 2018. Functional Characterization of the alb1 Orthologue Gene in the Ochratoxigenic Fungus *Aspergillus carbonarius* (AC49 strain). *Toxins (Basel)*. 12-10. doi: 10.3390/toxins10030120.
- Goliński, P., Hult, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chełkowski, J., Kneblewski, P., Szebiotko, K., 1984. Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine. *Applied and environmental microbiology*. 47, 1210-1212.
- Gordillo, M.A., Navarro, A.R., Benitez, L.M., De Plaza, M.I.T., Maldonado, M.C., 2009. Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp. Strain IBA 33. *Microbiol. Insights*. 2, 15-24. <https://doi.org/10.4137/MBIS995>.
- Gutarowska, B., Skóra, J., Zduniak, K., Rembisz, D., 2012a. Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *Int Biodeter Biodegrad.* 68, 7-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.002>.
- Gross-Steinmeyer, K., Weymann, J., Hege, HG., Metzler, M., 2002 .Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J Agric Food Chem.* 93, 8-45.
- Haidar, R., Roudet, J., Bonnard, O., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Fert, M., Gautier, T., Deschamps, A., Fermaud, M., 2016. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiol. Res.* 192, 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.003>.
- Haighton, L. A., Lynch, B. S., Magnuson, B. A., Nestmann, E. R., 2012. A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical reviews in toxicology.* 42, 147-168.
- Hahn, M., 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology.* 7, 133-141.
- Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Al-Obeed, R. S., Mridha, M. A. U., & Al-Huqail, A. A., 2013. Non-chemical strategies to control postharvest losses and extend the shelf life of table grape fruits. *Biological Agriculture & Horticulture : An International Journal for Sustainable Production Systems.* 29(2), 82-90.
- Harris, J. P. and Mantle, P. G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry.* 58, 709-716.
- Hassen, W., Abid-Essafi, S., Achour, A., Guezzah, N., Zakhama, A., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H., 2004. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Hum Exp Toxicol.* 23(7), 339-346.

Heidarzadeh, N., Ravari, S.B., 2015. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato. Arch. Phytopathology Plant Protect. 48, 13-16. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1140611>.

Hendrickse, R., Coulter, J., Lamplugh, S., Macfarlane, S., Williams, T., Omer, M. and Suliman, G., 1982. Aflatoxins and kwashiorkor : a study in Sudanese children. Br Med J (Clin Res Ed). 285, 843-846.

Henning, A., Fink-Gremmels, J., Leistner, L., 1991. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours (M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, and H. Bartsch, Eds.).

Horie, Y., 1995. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. Nippon Kingakukai Kaiho. 36, 73-76.

Huff, W. E., Wyatt, R., Tucker, T., Hamilton, P., 1974. Ochratoxicosis in the broiler chicken. Poultry Science. 53, 1585-1591.

Huff, W.E., Kubena, L.R., Harvey, R.B., 1992. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. Poultry Science. 71, 64-69.

Hussein, H. S. and Brasel, J. M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.

IARC Scientific Publications (2009), International Agency for Research on Cancer, (Lyon). Vol. 115, 255-260.

IARC., 1993. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances : food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume 56, IARC, Lyon.

Insam, H., Goberna, M., 2004. Use of Biolog® for Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd Ed.; Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands. 4, 853-860.

International Organization of Vine and Wine (OIVV). 2016. State of the world wine sector.

Interprofessional Grouping of Fruits (GIFRUIT). 2016. Manual of good agricultural practices. Table grape. Ministry of Agriculture, Republic of Tunisia.

Joint, F., 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *WHO food additives series*, 47.

Jouany, J., Yiannikouris, A. and Bertin, G., 2009. Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options Méditerranéennes, A*, 85, 205-224.

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P., Ongena, M., 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 456-468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187, 351-360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>.

- Kang, S.M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G.J., Lee, I.J., Lee, K.E., Kim, J.H., 2014. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian J. Microbiol.* 54, 427–433. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0476-6>.
- Kapetanakou, A.E., Panagou, E.Z., Gialitaki, M., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food control.* 20 (8), 725-732. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.008>.
- Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W., 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology.* 3, 937-947.
- Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., Johri, B.N., 2012. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus sp.* strain A₅F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Basic Microbiol.* 52, 670-678. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100463>.
- Laforgue R, Guérin L, Pernelle JJ, Monnet C, Dupont J & Bouix M., 2009. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1208–1218.
- Lea, T., Steien. K., Stormer. C., 1989. Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia.* 107, 153-159.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., & Chuenchitt, S., 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 113e121.
- Leong, S., Hocking, A.D., Pitt, J.I., 2008. Occurrence of fruit rots fungi (*Aspergillus* section Nigri) on some drying varieties of irrigated grape. *Aust. J Grape and Wine Res.* 10, 83-88. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00010.x>.
- Leroux, P., 2004. Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* (Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 195–222.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., Liao, X., 2016. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS ONE* 11, e0162125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>.
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X., Wu, H., Liu, W., Gao X., 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20, 43-52. <https://doi.org/10.1159/000323501>.
- Lopez de Cerain, A., Gonzalez-Penas, E., Jimenez, A.M., Bello, J., 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food and Additives Contaminants.* 19, 1058-1064.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A., 2003. Mycoflora and ochratoxin producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina. *Letters Appl. Microbiol.* 37, 179-184. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01376.x>.
- Mally, A., 2012. Ochratoxin A and mitotic disruption : mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicological Sciences.* 127, 315-330.

- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El-Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C., Daffonchio, D., 2013. Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *BioMed. Res. Int.* ID 491091. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/491091>.
- Manolova, Y., Manolov, G., Parvanova, L., Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Chernozemsky, I.N., 1990. Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly x-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A; a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat. Res.*,
- Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology.* 60, 218-237.
- Markaki, P., Delpont, C., Binet., Grosso, F., Dragacci, S., 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection.* 64, 533-537.
- Martínez-Culebras P.V., Ramón D., 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 147-153.
- Matos, A.D.M., Gomes, I.C.P., Nietsche, S., Xavier, A.A., Gomes W.S., Dos Santos Neto, J.A., Pereira, M.C.T., 2017. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 89, 2945-2954. Epub September 04, 2017. <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>.
- Medeiros, F. H. V. D., Martins, S. J., Zucchi, T. D., MELO, I. S. D., Batista, L. R., Machado, J. D. C., 2012. Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciência e Agrotecnologia.* 36, 483-497.
- Melki ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A., Mliki, A., 2007. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International Journal of Food Microbiology.* 113 (3), 245-250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.022>.
- Mie, A., Andersen, H.R., Gunnarsson, S., Kahl, J., Kesse-Guyot, E., Rembiałkowska, E., Quaglio, G., Grandjean, P., 2017. Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review. *Environmental Health.* 16, 111. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0315-4>.
- Miller, J.D., 1999. Mycotoxins. In *Encyclopedia of food science and technology.* Edited by F.J. Francis John Wiley, New York. 1698-1706.
- Molitor, D., Rothmeier, M., Behr, M., Fischer, S., Hoffmann, L., Evers, D., 2011. Crop cultural and chemical methods to control grey mould on grapes. *Vitis.* 50, 81-87.
- More, J., Galtier, P., Alvinerie, M., 1978. Toxicite de l'ochratoxine A. III. Effets pendant les stades initiaux de la gestation chez le rat. *Ann. Rech. vet.* 9(1), 169-173.
- Munimbazi, C., Saxena, J., Tsai, W.Y.J., Bullerman, L.B., 1997. Inhibition of production of cyclopiazonic acid and ochratoxin A by the fungicide iprodione. *J. Food Prot.* 60, 849-852. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.7.849>.
- Nelson, P. E., Dignani, M. C. and Anaissie, E. J., 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews,* 7, 479-504.
- Nguyen, M. T., 2007. "Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines". Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

- Noordman, WH., Reissbrodt, R., Bongers, RS., Rademaker, JL., Bockelmann, W., Smit, G., 2006. Growth stimulation of *Brevibacterium sp.* by siderophores. *J. Appl. Microbiol.* 101, 637-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02928.x>.
- Nunes, C., Usall, J., Teixed, N., Fons, E., Vinas, I., 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden delicious apples. *J. Appl. Microbiol.* 92, 247-255. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01524.x>.
- O'BRIEN, E. and DIETRICH, D. R., 2005. Ochratoxin A: the continuing enigma. *CRC Critical Reviews in Toxicology.* 35, 33-60.
- Office National Interprofessionnel des Vins (ONIVINS). 2005. Maîtrise des teneurs en OTA au vignoble.
- Ono, H., Kataoka, A., Koakutsu, M., Tanaka, K., Kawasugi, S., Wakazawa, M., Ueno, Y., Manabe, M., 1995. Ochratoxin A productibility by strains of *Aspergillus niger* group stored in IFO culture collection. *Mycotoxins.* 41, 47-51.
- Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). 2013.
- Otteneder, H. and Majerus, P., 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants* 17, 793-798.
- Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E. and Medina, B., 1998. L'ochratoxin A dans les vins. *Revue Française d'Oenologie* 169, 16-18.
- Palazzini, J.M., Dunlap, C.A., Bowman, M.J., Chulze, S.N., 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiol. Res.* 192, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>.
- Palumbo JD, O'Keeffe TL, Ho YS, Fidelibus MW., 2016. Population Dynamics of *Aspergillus* Section *Nigri* Species on Vineyard Samples of Grapes and Raisins. *J Food Prot.* 79(3):448-53. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-437.
- Pantelides, S.I., Christou, O., Tsolakidou, M-D., Tsaltas, D., Ioannou, N., 2015. Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biol. Control.* 88, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.021>.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Appl. Env. Microbiol.* 72, 680-685. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.680-685.2006>.
- Ponsone, M. L., Combina, M., Dalcero, A., & Chulze, S., 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 131e135.
- Petzinger, E and Weidenbach, A., 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of Ochratoxins. *Livestock Production Science.* 76, 245-250.
- Pfohl-Leskowicz, A et Castegnaro, M., 1999. L'Ochratoxine A dans: Mycotoxines: Evaluation et gestion du risqué, chapitre 9, Lavoisier, Tec & Doc, (Paris). 249-278.
- Pfohl-Leskowicz, A. and Manderville, R. A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 61-99.

- Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R. A., 2011. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. *Chemical research in toxicology*, 25, 252-262.
- Pham, N.P., Layec, S., Dugat-Bony, E., Vidal, M., Irlinger, F., Monnet, C., 2017. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics*. 18, 955. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4322-1>.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *Plos One*. 9, e85622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085622>.
- Pitt, J. I. and A. A. D. Hocking., 2009. *Fungi and food spoilage*, 3rd edition. Springer.
- Pisani, C., Nguyen, TT., Gubler WD., 2015. A novel fungal fruiting structure formed by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in grape berries. *Fungal Biol*. 119(9). 784-90. doi: 10.1016/j.funbio.2015.05.002.
- Pluhacek, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novak, J., Havlicek, V., 2016. Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 35, 35-47. <https://doi.org/10.1002/mas.21461>.
- Pohland, A.E., Neisheim, S., Friedman, L., 1992. Ochratoxin A, a review.-*Pure Appl. Chem.* 64, 1029-1046.
- Prusky, D., 2011. Reduction of the incidence of postharvest quality losses, and future prospects. *Food Security*. 3(4), 463-474.
- Puel, O., Galtier, P., Oswald, I. P., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*. 2, 613-631.
- Rai, M. K., Bonde, S. R., Ingle, A. P., Gade, A. K., 2012. Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 3, 22.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W.G., Xuwen, G., De Kievit, T., 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can. J. Microbiol.* 53, 901-911. <https://doi.org/10.1139/W07-049>.
- Ren, J.J., Shi, G.L., Wang, X.Q., Liu, J.G., Wang, Y.N., 2013. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 2343-2352. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1401-6>.
- Rezgui, A., Ben Ghnaya-Chakroun, A., Vallance, J., Bruez, E., Hajlaoui, M.R., Sadfi-Zouaoui, N., Rey, P., 2016. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biol. Control*. 99, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.005>.
- Ringot, D. C., A., Schneider, Y.J.; Larondelle, Y., 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem. Biol. Interact.* 18-46.
- Ribelin, W. E., Fukushima, K., Still, P.E., 1978. The toxicity of ochratoxin A to ruminants. *Can. J. Comp. Med.* 42, 172-176.
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M., Smilanick, J. L., 2012. Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 63(1), 141-147.
- Rooney-Latham, S., Janousek, S., Eskalen, C. N, A., Gubler, W. D., 2008. First Report of *Aspergillus carbonarius* Causing Sour Rot of Table Grapes (*Vitis vinifera*) in California. *Plant disease*. 92(4). 651. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0651A>.

- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., Borriss, R., 2011. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J. Biotechnol.* 155, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.006>.
- Rumora, L. and Žanić Grubišić, T., 2009. A journey through mitogen-activated protein kinase and ochratoxin A interactions. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 60,449-455.
- Rybakova, D., Cernava, T., Köberl, M., Liebming, S., Etemadi, M., Berg, G., 2015. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant Soil.* 1, 125-140. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2526-1>.
- Sanhueza R.M.V., 1996. (Embrapa- Comunicado técnico: Recomendações para controle pós-colheita das podridões de maçãs). Vol. 21. pp. 1-4.
- Sharma, B.S., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, A.T., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus.* 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. & Van Dijck, P. W., 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 59, 426-435.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochem.* 160, 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Senthil, R., Prabakar, K., Rajendran, L., & Karthikeyan, G., 2011. Efficacy of different biological control agents against major postharvest pathogens of grapes under room temperature storage conditions. *Phytopathologia Mediterranea.* 50, 55-65.
- Serra, R., Abrunhosa, L. s., Kozakiewicz, Z., & Venâncio, A., 2006. *Black Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology.* 88(1), 63-68.
- Serra R, Braga A & Venâncio A., 2005. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology* 156: 515-521.
- Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenstrom, S., Mshicileli, N., Sewram, V., 2003. Quantitation of ochratoxin A in south African wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 51, 1102-1106.
- Silveira N.S.S., Michereff S.J., Silva I.L.S.S., Oliveira S.M.A., 2005. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle (Revisão) *CAATINGA.* 18:283-299.
- Spadaro, D., Patharajan, S., Lorè, A., Garibaldi, A., Gullino, M. L., 2012. Ochratoxigenic Black Species of *Aspergilli* in Grape Fruits of Northern Italy Identified by an Improved PCR-RFLP Procedure. *Toxins (Basel).*4(2): 42–54.
- Soleas, G.J., Yan, J., Goldberg, D.M., 2001. Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 49, 2733-2740.
- Somma, S., Perrone, G., Logrieco, A.F., 2012. Diversity of black Aspergini and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 131-147. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/43872362>.

- Steyn, P.S. and Holzapfel, C.W., 1967. The synthesis of ochratoxin A and B metabolites of *Aspergillus ochraceus*.- Wihl. Tetrahedron, **23**, 4449-4461.
- Stoev, S. D., Denev, S., Dutton, M. F., Njobeh, P. B., Mosonik, J. S., Steenkamp, P. A., Petkov, I., 2010a. Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs. *Mycotoxin research*, **26**, 31-46.
- Stoev, S. D. and Denev, S. A. (2013). Porcine/chicken or human nephropathy as the result of joint mycotoxins interaction. *Toxins*, **5**, 1503-1530.
- Thakur, A. K., & Saharan, V. K., 2008. Effectiveness of shrink wrap on quality and shelf life of apple. *Journal of Food Science and Technology*. **46**(5), 440-445.
- Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C., 2012. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathol. Mediterr.* **51**, 158-174. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/43872364>.
- Valdés-Gómez, H., Fermaud, M., Roudet, J., Calonsec, A., Gary, C., 2008. Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. *Crop Prot.* **27**, 1174-1186.
- Van Der Merwe, K. J. S., P.S., Fourie, L., Scott, D.B., Theron, J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. 1112-1113.
- Vettorazzi, A., Van Delft, J., DE Cerain, A. L., 2013. A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food and Chemical Toxicology*. **59**, 766-783.
- Vettorazzi, A., González-Peñas, E., De Cerain, A. L., 2014. Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model. *Food and Chemical Toxicology*. **72**, 273-288.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit. Contam.* **25**, 193-202. <https://doi.org/10.1080/02652030701744546>.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit. Contam.* **25**, 193-202.
- Walker, M. R., 1999. « Mycotoxines présentant un intérêt croissant : ochratoxines ».- In : Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNUC sur les Mycotoxines (1999).- Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/colloques/ogm1/04.pdf>.
- Walker, A.-S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M., Leroux, P., 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manag. Sci.* **69**, 667-678.
- Weidenburner, M. 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins.-*Ochratoxicosis* 181, *Ochratoxin A* 181-186, -*Ochratoxin B* 186, -*Ochratoxin C* 186, -*Ochratoxins* 187, -*Aspergillus* 26-31, -*Penicillium* 203-207, edit : Springer-Berlin (DEU), 296p.
- Weisskopf, L., 2013. The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz : Formatex Research Center, Spain, pp. 1352-1363.
- West, E.R., Cother, E.J., Steel, C.G., Ash, G.J., 2010. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can. J. Microbiol.* **56**, 209-216. <https://doi.org/10.1139/W10-004>.

- Wicklow, D.T., Dowd, P.F., Alfatafta, A.A., and Gloer, J.B. 1996. Ochratoxin A: an antinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. *Canadian Journal of Microbiology*. 42,1100-1103.
- Wilcox, W.F., Gubler, W.D., Uyemoto, J.K., 2015. *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*. 2nd edition. The American phytopathological society. 230p.
- Whipps, J.M., 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.* 107, 127-142. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04887.x>.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 425-441. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.002233>.
- Yahia, E.M. (ed.), 2009. *Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., Bennett, J. W., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin.
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955-963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5).
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl. Env. Microbiol.* 78, 5942-5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>.
- Zhao, Y., Li, P., Huang, Y., 2013. Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. *World J. Microbiol. Biochem.* 29, 411-420. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1193-0>.
- Zhou, T., Northover, J., Schneider, K.E., 1999. Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Plant Pathol.* 21, 375-381. <https://doi.org/10.1080/07060669909501174>.
- Zepnik, H., Schauer., Dekant, W., 2001. Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? *Toxin Sci.* 59, 59-67.
- Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13, 655-668. <https://doi.org/10.1080/02652039609374451>.

Valorisation des résultats

Publication



Isolation, identification and *in vitro* characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes

Mayssa Arfaoui^{a,b,*}, Jessica Vallance^{b,c}, Emilie Bruez^b, Awatef Rezgui^b, Imen Melki^d, Samir Chebil^d, Najla Sadfi-Zouaoui^a, Patrice Rey^{b,c}

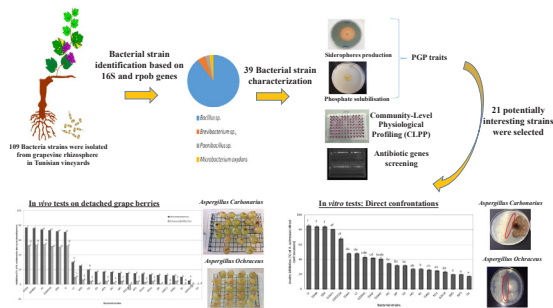
^a Mycologie, Pathologies et Biomarqueurs, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia

^b INRA, UMR1065 Santé et Agro-écologie du Vignoble (SAVE), ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon, France

^c Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, UMR1065 SAVE, F-33130 Gradignan, France

^d Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria (CBBC), Hammam-Lif, Tunis, Tunisia

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Antifungal activity
Aspergillus carbonarius
Aspergillus ochraceus
Bacillus spp.
Bacillus pumilus
 Biocontrol

ABSTRACT

Aspergillus spp. are fungal pathogens that attack the grape and that are known for their secretion of mycotoxins, in particular, ochratoxin which is very toxic. A total of 39 bacterial strains isolated from the rhizosphere in Tunisian vineyards were identified using 16S rDNA and *rpob* gene sequencing: 35 were *Bacillus* spp. strains, 2 were *Brevibacterium* spp., 1 was *Paenibacillus* sp. and 1 strain was *Microbacterium oxydans*. Biochemical and microbiological screenings revealed that those 39 strains (i) metabolized differently carbon sources, (ii) possessed antibiotic genes and (iii) produced siderophores. Based on their PGP traits, 21 strains were selected and tested *in vitro* for their antagonistic effect against two fungal pathogens, *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*. All the tested antagonists were able to reduce the growth of *A. ochraceus*, with *Bacillus amyloliquefaciens* being the most efficient; and *A. carbonarius*, in particular *Bacillus pumilus*. *In vitro* screening using detached berries showed the potential of *B. pumilus* strain G3AX for inhibiting contaminations by *Aspergillus* spp., that are OTA-producing fungi. At the berry surface, the efficacy of the bacterial strains strongly depended on the presence or absence of wounds.

1. Introduction

Grapevine is one of the most cultivated fruit crop species in the

world. The world vineyard spreads over five continents and has a surface area of 7,5 million hectares (International Organization of Vine and Wine (OIVV) (2016)). In Tunisia, viticulture has begun in antiquity

* Corresponding author at: INRA, UMR 1065 Santé et Agro-écologie du Vignoble, ISVV, 71 av. Edouard Bourleaux, 33882, Villenave d'Ornon, France.
 E-mail address: arfaouimayssa06@gmail.com (M. Arfaoui).

as in other countries of the Mediterranean Basin, thanks to Phoenicians and Carthaginians. The vineyard sector occupies an important place in the national economy. It generates a volume of employments of about 1 million working days and financing in the trade balance by the annual export of 37,000 hl of wine to European countries (Interprofessional Grouping of Fruits (GIFRUIT) (2016)).

Currently, the Tunisian vineyard occupies 22,000 ha of which 12,000 ha are planted with table grape cultivars (Interprofessional Grouping of Fruits (GIFRUIT) (2016)). Vine plantations are concentrated in the North, the centre and the South, where planted areas spread quickly from one year to another (Interprofessional Grouping of Fruits (GIFRUIT) (2016)). The most cultivated vine cultivars in the Tunisian territory are Muscat d'Italie, Seedless Superior and Muscat d'Alexandrie. Despite its importance, domestic production of table grape represented 133,500 tons in 2016 (Agricultural Statistics Analysis (ASA) (2016)), but it remains dependent on weather conditions and disease resistance. Fungi are the main microorganisms responsible for losses in agriculture, 83% of plant diseases are due to fungi and 17% being caused by bacteria and viruses. Vine is known for its high sensitivity to fungal diseases and pests that seem to be the main cause of the decrease in production in the Tunisian vineyard. *Aspergillus* spp. are filamentous fungi attacking grape berries that can alter the hygienic quality of grapes. Contamination of grapes and grape products by *Aspergillus* spp. belonging to the Nigri section is known to occur very widely. The species *Aspergillus niger*, *A. tubingensis* and *A. carbonarius* are included within this section and during their growth, these fungi are able to produce mycotoxins including ochratoxin A (OTA) and fumonisin B2 (FB2) (Battilani and Pietri, 2002; Bejaoui et al., 2006; Filali et al., 2001; Ospital et al., 1998; Somma et al., 2012). OTA is the most common mycotoxin detected in grapes and grape derived products, such as grape juices, wines and dried vine fruits (Aksoy et al., 2007; Visconti et al., 2008; Zimmerli and Dick, 1996).

Although the application of fungicides remains one of the most powerful and cost-effective tools to reduce the incidence of fungal pathogens in most crops (Munimbazi et al., 1997), the European Union has established a strict legislation concerning their use, due to the development of resistant fungal strains and the negative effects of fungicides on human health and the environment (De Costa and Bezerra, 2009). Maximum residue levels of pesticides were established for all foodstuffs intended for human or animal consumption in the European Union (European Commission, 2013). Recognizing the real danger of the presence of chemicals or fungicides in food for humans and animals (carcinogenic properties), farmers and consumers are increasingly turning to organic practices and the consumption of natural and healthy products (Mie et al., 2017).

Biological control is one of the most promising alternatives to unpopular synthetic fungicides, and research on postharvest biocontrol has increased in recent decades (Droby et al., 2009). The main characteristics of an ideal biocontrol agent were defined by Wilson and Wisniewski (1989), and are related to biosafety, activity in a range of environments and against a variety of pathogens, and ease of management and use. Members of the genera *Bacillus* (Kumar et al., 2012; Ren et al., 2013), *Pseudomonas* (Cirvilleri et al., 2005; Zhou et al., 1999) and *Pantoea* (Nunes et al., 2002), among others, were shown to be effective in the biological control of mould rots. *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* showed significant capacity for the biocontrol of bacteria (Bressan, 2003; Fravel, 2005). Bacteria of the genus *Bacillus* have ample capacity for the production of secondary metabolites with antimicrobial activity, the main source of their antagonistic potential against pathogens in plant tissues (Rückert et al., 2011). Antimicrobial compounds with circular lipopeptide structures, produced by many strains of the genus *Bacillus*, demonstrated significant antifungal and antibacterial activity (Dimkic et al., 2013; Yu et al., 2002).

In that context, this study was conducted in order to investigate the potential of grapevine rhizobacteria as biocontrol agents against ochratoxigenic fungi, i.e. *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*.

Different approaches were used: i) isolation and identification of bacterial candidates by sequencing the 16S rRNA and *rpoB* genes. ii) The abilities of the isolated bacteria in terms of control of plant pathogens: detection of antibiotic genes (4 fengycins encoded A, B, D and E; 1 bacillomycin), degradation of different sole-carbon sources, production of siderophores and phosphate solubilisation, were tested. iii) Based on those criteria, the 21 best performing isolates were then selected to test their inhibitory effects *in vitro* against two ochratoxigenic fungi *A. ochraceus* and *A. carbonarius*, by dual confrontations onto agar plates and using a laboratory-scale detached berries test.

2. Materials and methods

2.1. Pathogenic fungal strains

From the fungi collection of the laboratory of Molecular Physiology of Plants in Biotechnology Center of Borj cedria, two of the most OTA-producing strains, i.e. ASP31 and ASP73, were selected for antagonistic assays. The ITS sequences of the two species (*Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*) are available at the GenBank database under accession numbers MH249060 and MH249061.

2.2. Bacterial strains

2.2.1. Plant material and sampling

In order to study the bacterial microflora inhabiting the rhizosphere of Tunisian grapevines, a sampling was carried out in summer 2013 in two vineyards located in the insahel region situated in the east central part of Tunisia (one is a biological plot, the other is a conventional one). These vineyards consisted of mature grapevines (10-years old plants) of the table grape cultivar, Rich Baba Sam. They were irrigated with a drip irrigation system. Rhizospheric soil samples (0–15 cm) were collected from 10 distant points of each plot: 20 in total.

2.2.2. Isolation of bacteria from the rhizosphere of Tunisian vineyards

Rhizobacteria were isolated according to the serial dilution technique, which consisted of mixing 8 g of each of the 20 soil samples, with 50 ml of a physiological saline solution (0.85% NaCl in distilled water). The solutions thus obtained were stirred for 15 min and filtrated, before being subjected to a dilution series (from 10^{-1} to 10^{-9}) and inoculated on a Luria-Bertani culture medium (LB, 5 g of yeast extract, 10 g of peptone, 10 g of NaCl and 15 g of bacterial agar). Petri dishes were then incubated 24 h at 25 °C.

After incubation, individualized colonies of different appearances were subcultured onto LB medium. The isolates thus obtained were purified by 3 successive subcultures on the same medium. A total of 109 bacterial strains were recovered from the soil samples collected. The 39 most abundant were selected based on morphological differences and subsequently purified onto LB agar and characterized.

2.2.3. Identification of bacteria by sequencing the 16S rRNA and *rpoB* genes

Genomic DNA from the 39 selected bacterial strains was extracted from pellets obtained after centrifugation of pure cultures grown in Tryptone Soy Broth (TSB, Conda) by using the commercial kit Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex) following the manufacturer's instructions. The DNA extracts were quantified with a nanodrop (ND-1000, ThermoScientific, Labtech) and homogenized at a concentration of 20 ng/μl. DNA samples were sent to Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom) for sequencing the 16S rRNA and *rpoB* genes, respectively with the primers 799f and 1492r, and *rpoBf* and *rpoBr* (Table 1). For species level identification, sequences were compared with the GenBank database by using the Blastn program (Altschul et al., 1997). The 16S rRNA and *rpoB* are available at the Genbank database under accession numbers MH236385 to MH236421.

Table 1
Pairs of primers used.

Applications	Gene	Primer name	Sequence 5'3'	Amplicon size	Annealing T °C	
Sequencing	Fungi	ITS	ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA	650 bp	59 °C
			ITS4	A TCCTCCGCTTATTGATATGC		
	Bacteria	16S rRNA	799f	AACMGGATTAGATACCCCKG	750 bp	52 °C
			1492r	GTTACCTTGTACGACTT		
			rpoB	rpoBf		
rpoBr	GNGTYTCRATYGGACACAT					
Antibiotics screening	Lipopeptide	Fengycin	FENAf	GACAGTGCTGCCTGATGAAA	900 bp	54 °C
			FENAr	GTCCGTGCATGAAATGTACG		
			FENBf	ATCCATGGTTAAAAACAAAAT	950 bp	54 °C
			FENBr	ACGGATCCATGCTATTGGCAGC		
			FENDf	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT	950 bp	53 °C
		FENDr	GCTGTCGGTTCTGCTTTTTC			
		Bacillomycin	FENef	GCCAAAAGAAAACGAGCAG	950 bp	53 °C
			FENEr	GTCCGAGCTAACGCTGAAAAC		
			BACCF	GAAGGACACGGCAGAGAGT	900 bp	60 °C
			BACCr	CGTGATGACTGTTTCATGC		

2.2.4. Community-level physiological profiling (CLPP) of rhizobacteria

Bacterial strains in suspension were quantified by fluorochrome staining (500 µl Chemsol B16 buffer + 2.5 µl fluorochrome Chemchrome V6 fluorescein acetate; Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) followed by epifluorescent direct counts using an optical microscope (Model BH2, Olympus France, Rungis, France). A minimum of 300 cells was counted in at least 10 different fields of view and the average number of dyed cells per field was finally expressed as CFU/ml. The isolated bacteria were then distributed in 96-well Biolog™ EcoPlates (AWEL International) (150 µl/well) with a concentration of 10⁶ CFU/ml. These 96-well plates contained 31 different carbon sources plus a control well in triplicate. The plates were incubated at 26 °C in the dark. Tetrazolium violet redox dye was used for each well as a colour indicator if added microorganisms utilized the substrates (Insam and Goberna, 2004). Absorbance or optical density (OD) was measured at a wavelength of 590 nm with a microplate reader (Multimo microplate reader, Synergy HT, Biotek) after 24 h, 48 h and 5 days of incubation. To minimize the effect of difference in densities between plates, data were standardized as follows: the average well colour development (ACWD) was calculated for each plate; then, the blanked absorbance value of each well was divided by the ACWD of the corresponding plate to get a corrected OD value (Garland and Mills, 1991). All corrected OD values were set to fall within 0 and 2 (boundary limits) and were then used for Principal Components Analyses with R (version 3.1.3.).

2.2.5. Antagonistic and plant growth Promoting (PGP) traits screening

Detection of antibiotic genes. The 39 selected bacterial strains were screened for the production of lipopeptide (LP) antibiotics by using specific primers that amplify genes from the fengycin and iturin families. Four genes of 4 fengycin (A, B, D and E) and 1 of iturin (a bacillomycin gene) were searched for (Alvarez et al., 2011; Lin et al., 1998; Ramarathnam et al., 2007). PCR assays were performed in a Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf) in 30 µl reaction volume consisting of 3 µl of buffer (10X), 1 µl of MgCl₂ (50 mM), 0.6 µl of dNTP (10 mM), 0.6 µl of each primer (Table 1), 3 µl of BSA (10 µg/µl) (New England Biolabs), 0.1 µl of Silver Star DNA polymerase (Eurogentec), 19.1 µl of sterile distilled water and 2 µl of DNA (20 ng/µl). PCR products were visualized by 2% TBE gel electrophoresis.

Siderophore production. Bacterial strains were tested for their ability to produce siderophores under Fe³⁺ limiting conditions by a plate assay adapted from Schwyn and Neilands (1987). Fresh cultures were plated onto CAS blue-agar [2.5% nutrient broth (NB, Conda), 1.5% agar, 0.1 M piperazin-1,4-bisethanesulfonic acid (PIPES), 10 µM Chrome Azurol S (Sigma) and 0.2 mM hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA, Sigma)]. When Fe³⁺ was removed from the Chrome Azurol S complex

by high-affinity bacterial siderophores, the colour of plates changed from blue to orange. Siderophore production was then measured after one week of incubation based on the size of the orange haloes (ds) formed around the colonies. The strains were denoted sid+, sid++ and sid+++ respectively when 0 mm < ds ≤ 5 mm, 5 < ds ≤ 10 mm and ds > 10 mm. The experiment was made in triplicate and repeated three times.

Phosphate solubilisation. The 39 bacterial strains were further tested for their ability to solubilise phosphates on Pikovskaya agar medium (PVK) [(NH₄)₂SO₄, 0.5 g/l; yeast extract, 0.5 g/l; calcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂), 5 g/l; KCl, 0.2 g/l; Magnesium sulphate (MgSO₄·7H₂O), 0.1 g/l; glucose, 10 g/l; Agar, 15 g/l; MnSO₄·2H₂O, 0.002 g/l; FeSO₄·7H₂O 0.002 g/l; pH = 7]. Bacterial plugs (5 mm diameter) from fresh bacterial cultures were placed on the centre of PVK Agar plates and incubated at 28 °C. Five repetitions were made for each bacterial strain and the experiment was repeated three times. The solubilisation zone was determined 10 and 15 days after inoculation by subtracting the diameter of bacterial colony from the diameter of total zone (dp). The strains were denoted phos+, phos++ and phos+++ respectively when 5 mm < dp ≤ 15 mm, 15 mm < dp ≤ 30 mm and dp > 30 mm (Rezgui et al., 2016).

Based on the previously described characterization assays, the 21 most promising bacterial strains were evaluated for their biocontrol potential against *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*.

2.3. In vitro antagonism of bacteria against two ochratoxigenic fungi *A. ochraceus* and *A. carbonarius*

2.3.1. Direct confrontation assays

The antagonist activity of bacterial isolates was tested against *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*, i.e. 2 ochratoxigenic fungi frequently found in grapevine, using the dual culture technique described by Déniel et al. (2004). Bacterial strains were streaked at the edges of Petri plates containing Potato Dextrose Agar (PDA, Biokar diagnostics, France) and, after 48 h of incubation at 27 °C, a 6 mm mycelial plug of each pathogenic fungus was placed in the centre of each plate. The plates were then incubated at 27 °C for 5 days. All experiments were performed in triplicate and repeated three times. The percentage of growth inhibition was calculated using the formula, (R₁-R₂)/R₁ × 100, where R₁ is the radial distance (mm) grown by pathogenic fungi in the direction of the antagonist, and R₂ is the radial distance (mm) grown by pathogenic fungi in control plates (Whipps, 1987).

2.3.2. Volatile bacterial substances assays

Rhizobacteria were tested for their ability to produce volatile

Table 2
Description and *in vitro* screening results of the bacterial strains.

Strains	Cropping management	Molecular screening		Antagonistic ^a and PGP ^b traits						
		16S rDNA gene (GenBank ref %id)	rpoB gene (GenBank ref %id)	FeA	FeB	FeD	FeE	Bacc	Phosphate solubilisation	Siderophore production
KD1	Conv	<i>Brevibacterium frigiditolerans</i> (99%)	–	+	+	–	+	–	–	+++
I3L	Org	<i>Paenibacillus</i> sp. (97%)	–	+	+	+	+	–	–	++
G3AM1	Org	<i>Bacillus</i> sp. (97%)	<i>Bacillus</i> sp. (97%)	+	+	+	+	+	–	+
G3AX1	Org	<i>Bacillus siamensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	+
G4B2	Org	<i>Bacillus mojavensis</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	–	+
G3AF2	Org	<i>Microbacterium oxydans</i> (99%)	–	+	–	–	–	–	–	+
J4F	Org	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	+
G3	Org	<i>Bacillus endophyticus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	+	+	+	+	–	–	+
G5	Org	<i>Bacillus endophyticus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	+	+	+	+	–	–	+
I1	Org	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (99%)	–	+	+	+	+	–	–	+
I2	Org	<i>Bacillus axarquiensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	+
I2M	Org	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	++
J4C	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	–	+	–	–	++
J4D	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	++
G5A1	Org	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	+	+	+	–	–	–	++
G5D	Org	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	–	–	+
G3AX2	Org	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	+	+	+	+	–	–	+
G3AX	Org	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	–	+	+	+	+	–	+	+
k2	Conv	<i>Bacillus</i> sp. (98%)	–	+	+	–	+	–	–	+++
I4	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	+
M4	Conv	–	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	+	–	–	–	–	–	+
K4S	Conv	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	+	+	+	+	–	–	+
L2	Conv	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	++
L3	Conv	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	–	+	+	–	–	–	–	+
J4F1X	Org	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	+	–	–	+	–	–	+
K2E1	Conv	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	–	–	–	–	–	–	–	+
I2C	Org	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	+
G4B1	Org	<i>Bacillus subtilis</i> (100%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	–	+	+	+	–	+
G3AX1M	Org	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	–	–	+	+	–	+	+
G4A1	Org	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	–	++
G3A3	Org	<i>Bacillus axarquiensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	–	+	–	–	++
G5C	Org	<i>Bacillus endophyticus</i> (99%)	–	+	–	+	–	–	–	+
J1XM	Org	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	–	+	+	+	+	–	–	+
K3	Conv	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	–	–	–	–	–	+++
G3A2	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99%)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	–	–	++
K2E1X	Conv	<i>Bacillus</i> sp. (98%)	–	+	+	–	+	–	+	+
G3AF1	Org	<i>Brevibacterium halotolerans</i> (99%)	–	+	+	+	+	–	–	+
J4FS	Org	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	+	+	+	+	–	–	++
G3A	Org	–	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	+	+	+	+	–	+	+

Org: organic cropping management, Conv: conventional cropping management, Bacc: bacillomycin, Fe: fengycin.

^a Antagonistic traits: antibiotic genes, siderophore production.

^b Plant Growth Promoting (PGP) trait: phosphate solubilisation.

substances inhibiting fungal growth using the double plate technique. Strains of *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius* were grown on Malt Extract Agar (MEA) for 7 days at 27 °C in the dark so that the colonies reached a sufficient size of 3.1 cm radius on average before being inverted over the Tryptic Soy Agar (TSA, Conda) streaked dishes containing the bacterial strains to test and sealed with Parafilm. This arrangement allowed the Petri plates inoculated with the *Aspergillus* strains not to be contaminated by the bacteria that may fall. Plates were incubated at 27 °C in the dark. 10 repetitions were made for each bacterial strain and the experiment was repeated three times. The fungal growth was measured after 5 and 7 days of incubation as compared to the control. The control plates had only each of the two *Aspergillus* species growing in them.

2.4. Grape berry rot bioassays with *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*

For *in vitro* grape berry rot bioassays, table grapes (cultivar:

Thompson Seedless) originating from the supermarket were washed for 15 min under continuous tap-water flow. Then, they were surface disinfected via immersion in sodium hypochlorite solution (50 g/l; pH 7.2) for 10 min, rinsed three times with sterile distilled water and then left to dry at room temperature. Undamaged grape berries were selected visually and carefully cut off from the grape bunches, using scissors, with the pedicel attached.

The efficacy of bacteria against both *A. ochraceus* and *A. carbonarius* was tested on wounded and unwounded berries. The experimental design consisted of 20 berries per treatment (strain x pathogen x wounded–unwounded). Unwounded berries were dipped in bacterial suspensions (LB medium). For wounded berries, three artificial wounds (1–1.5 mm in diameter) were made using a sterile pipette tip. Then, 10 µl of each bacterial strain suspension were introduced into each wound site. The control treatments with wounded and unwounded berries consisted of: (i) UUC (untreated uninoculated control) untreated with the bacteria and uninoculated with the pathogen, (ii) UC (untreated control) inoculated with mycelium plugs of the pathogen only,

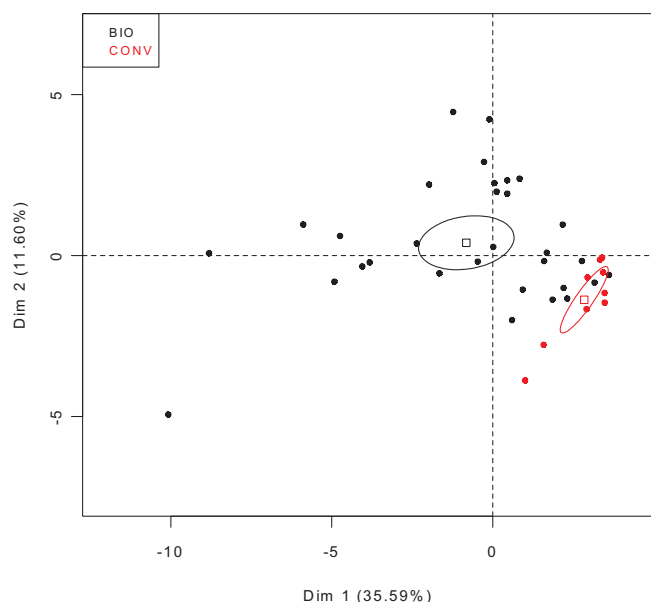


Fig. 1. Principal Component Analysis (PCA) of bacterial strains isolated from the rhizosphere of conventional and organic Tunisian vineyards based on their catabolic profile from Biolog™ Ecoplates. Points represent means of 3 replicate samples. The variation (%) explained by each PCA axis is given in brackets. Biolog™ Ecoplates were incubated 48 h at 27 °C in the dark.

(iii) MC (medium control) untreated and uninoculated controls sprayed only with sterile bacterial LB culture medium, (iv) FC (fungicide control) berries sprayed to runoff, using an EcoSpray sprayer (A 520) with a fungicide solution of Fluazinam (Sekoya, Syngenta France SAS, 50% a.i., 250 g a.i. 100l) (Haidar et al., 2016).

In order to allow bacteria to better colonize the berries before pathogen inoculations, 20 berries were placed on a metallic grid in plastic boxes (19 × 13 × 4 cm) filled with 100 ml of sterile distilled water and placed into a controlled growth incubator (Conviron CMP-5090; Winnipeg, Manitoba, Canada) at 28 °C in the dark for 24 h. After incubation, the centre of each wounded and unwounded fruit was inoculated with a mycelial plug (4 mm in diameter) of either *A. ochraceus* or *A. carbonarius* with the mycelial side facing the berry surface. The humidified boxes for *A. ochraceus* and *A. carbonarius* were then replaced in the growth chambers at 28 °C. For each berry, the percentage of rotten berry surface area was visually scored, and the average rot severity of each treatment was calculated as described by Haidar et al. (2016). Development of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* rot severity was assessed at 8 dpi on wounded and unwounded berries. The experiment was repeated two times.

2.5. Statistical analyses

All the statistical analyses were done using R statistical software, version 3.1.3. The data were first subjected to the Shapiro-Wilks and Levene's tests to check the normality and equality of variances before being subsequently subjected to the nonparametric Kruskal-Wallis test and the relative contrast effects analysed by the nparcomp package (version 2.0). For CLPP data, in the Vegan R-Package, the Anosim test using Bray-Curtis distance was employed to compare the data (Rezgui et al., 2016). For the grape berries rot bioassays, analyses of variance (ANOVAs) and Tukey's post-hoc tests were done using the Rcmdr R-Package.

3. Results

3.1. Characterization of the bacterial strains isolated from the rhizosphere of Tunisian vineyards

Based on partial 16S rRNA and *rpoB* genes sequencing (Table 2), the majority of the bacterial strains belonged to the *Bacillus* genus (34 strains): *Bacillus velezensis* (7 strains), *B. amyloliquefaciens* (6 strains), *B. endophyticus* (4 strains), *B. safensis* (4 strains), *B. pumilus* (3 strains), *B. subtilis* (3 strains), *B. thuringiensis* (2 strains), *B. mojavensis* (1 strain), *B. weihenstephanensis* (1 strain), *B. simplex* (1 strain), *B. cereus* (1 strain) and 3 strains of *Bacillus* sp. Other bacterial species were identified: *Brevibacterium* species (2 strains), i.e. *Brevibacterium halotolerans* (1 strain) and *B. frigiditolerans* (1 strain), *Microbacterium oxydans* (1 strain) and *Paenibacillus* sp. (1 strain).

The 5 genes coding for the screened antibiotics were detected in three strains: *Bacillus* sp. G3AM1, *B. mojavensis* G4B2, and *B. subtilis* G4A1. Twenty-one strains possessed the 4 fengycin genes (19 *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp. and *Brevibacterium halotolerans*) while the other strains expressed at least 1 out of 4 genes. For the strain of *B. simplex* K2E1, none of the 5 genes were detected (Table 2).

Regarding the PGP traits, i.e. phosphate solubilisation and siderophore production, only 4 strains out of 39 demonstrated both of the characteristics evaluated: *B. pumilus* G3AX, *B. velezensis* G3AX1M and G3A, and *Bacillus* sp. K2E1X (Table 2). None of the other strains were able to solubilize phosphates whereas all the bacteria produced siderophores. Three strains produced the greater halo zones, ranging from 14.5 to 18 mm (sid + + + strains) and 23 strains developed small haloes ranging from 1 to 5 mm (sid + strains).

3.2. Community-level physiological profiles (CLPP) of the isolated rhizobacteria

The strains distribution on the principal plan generated by the PCA is represented in Fig. 1. PCA eigenvalues indicate that the first two axes, Dim 1 and Dim 2, explain 47.2% of the total variability. Globally, no distinctive pattern in the use of carbon sources was observed between the 39 bacterial strains isolated from the rhizosphere of Tunisian vineyards (data not shown) except when the type of cropping management was considered, i.e. organic or conventional (Fig. 1). Bacterial species metabolized differently carbohydrates and amino acids depending on the farming system, i.e. organic or conventional.

3.3. In vitro antagonism of bacteria against two ochratoxigenic fungi

3.3.1. Direct confrontations

The 21 selected bacterial strains showed variable inhibition percentages for the growth of the two fungal pathogens tested, i.e. *A. carbonarius* (P < 0.01) and *A. ochraceus* (P < 0.01). They ranged from 11.9% to 80.9% and from 17.2% to 85.2% respectively for *A. carbonarius* (Fig. 2) and *A. ochraceus* (Fig. 3). The most efficient antagonistic bacteria were *Bacillus pumilus* (G3AX) and *Bacillus amyloliquefaciens* (I2) respectively against *A. carbonarius* (Fig. 2) and *A. ochraceus* (Fig. 3).

3.3.2. Volatile bacterial substances

All the 21 bacterial isolates tested showed strong fungal growth inhibition activity via volatiles. Variable inhibition percentages for the growth of the two fungal pathogens tested were obtained: they ranged from 20 to 93.3% and from 8.3 to 97.6% respectively for *A. carbonarius* (Fig. 4) and *A. ochraceus* (Fig. 5). The most efficient antagonistic bacteria were *Bacillus amyloliquefaciens* (I2) and *Bacillus* sp. (G3AM1) respectively against *A. carbonarius* (Fig. 4) and *A. ochraceus* (Fig. 5).

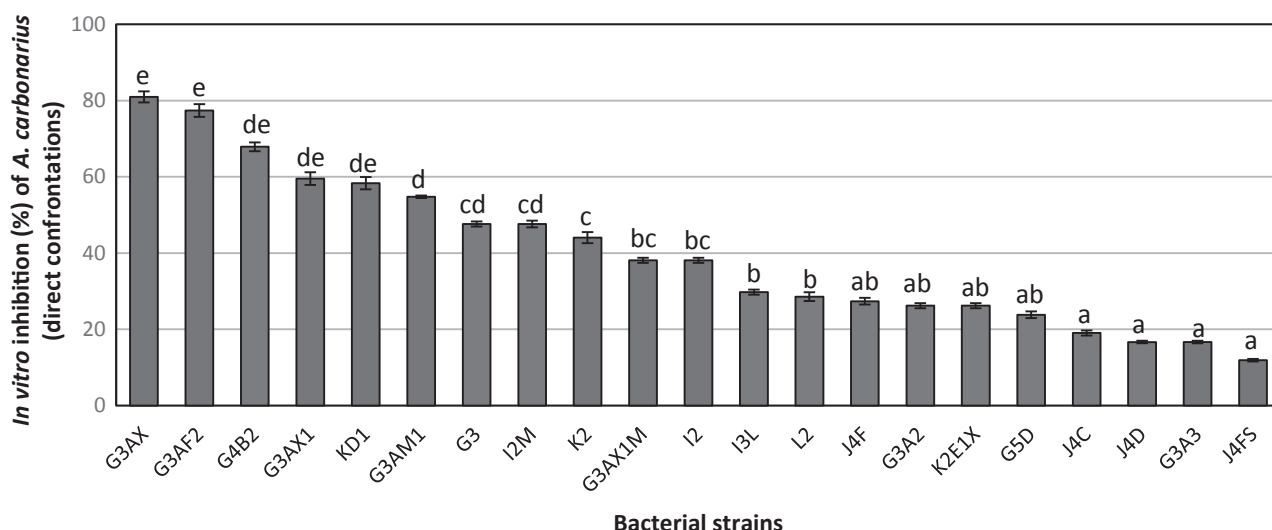


Fig. 2. Effect of the rhizobacterial isolates, applied as 24 h-bacterial cultures, on the growth of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. Mean values (3 replicates) sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis’ non-parametric relative contrast effects post-hoc test at P < 0.05.

3.4. Grape berry rot bioassays with *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*

Severity reduction results are shown in Figs. 6 and 7. The untreated controls UC (berries inoculated with the pathogen only) in both bioassays showed notable *Aspergillus* rot symptoms. In the *A. carbonarius* bioassay, overall rot severity reached 77% and 54% with the untreated control (UC) treatments respectively on wounded and unwounded berries (data not shown). In the *A. ochraceus* bioassay, the overall rot severity values reached with the untreated controls (UC) were 51% on wounded berries and 12% on the unwounded fruit test (data not shown). In both bioassays, grape berries for uninoculated UUC and MC controls were always asymptomatic during the entire incubation period. The controls FC treated with a fungicide (Fluazinam) applied at the registered dosage, significantly reduced *A. carbonarius* and *A. ochraceus* symptoms respectively by 74% and 47% on wounded berries and by 54% and 12% on unwounded berries.

3.4.1. Inhibition of *A. carbonarius* berry rot development by bacterial strains

The inhibition rates of 21 bacterial strains for controlling *A.*

carbonarius rot development at the surface of detached grape berries are shown in Fig. 6. On wounded berries, 20 strains out of the 21 tested, significantly protected grape berries from *A. carbonarius* rot compared with the untreated control (UC) inoculated with the pathogen only. Their inhibition levels ranged from 10% to 77%. However, 5 bacterial strains were characterized by inhibition rates higher than 70%. The highest value corresponds to the strain G3AX (*B. pumilus*). On unwounded berries, only 5 strains had significant inhibition levels compared to the UC control (P > 0.05), the highest value being exhibited by *Bacillus* sp. G3AM1 (54%). Furthermore, pretreatment with two strains (K2E1X and G3AX1) tended to increase *A. carbonarius* symptoms on unwounded fruits (this was not significant at P = 0.05 compared to the corresponding untreated control UC).

3.4.2. Inhibition of *A. Ochraceus* berry rot development by bacterial strains

The results for the reduction of *A. ochraceus* rot lesions are shown in Fig. 7. On wounded berries, only 9 strains significantly reduced the development of *A. ochraceus* rot compared with the untreated control (UC) inoculated with the pathogen only. Their inhibition levels ranged from 22% from 50% with *Bacillus pumilus* G3AX being the most efficient

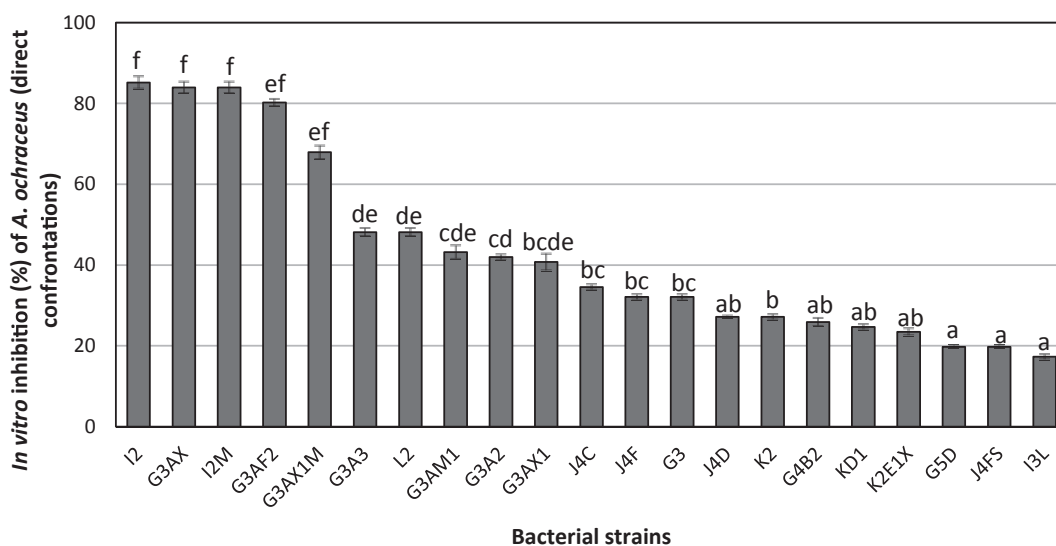


Fig. 3. Effect of the rhizobacterial isolates, applied as 24 h-bacterial cultures, on the growth of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus ochraceus*. Mean values (3 replicates) sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis’ non-parametric relative contrast effects post-hoc test at P < 0.05.

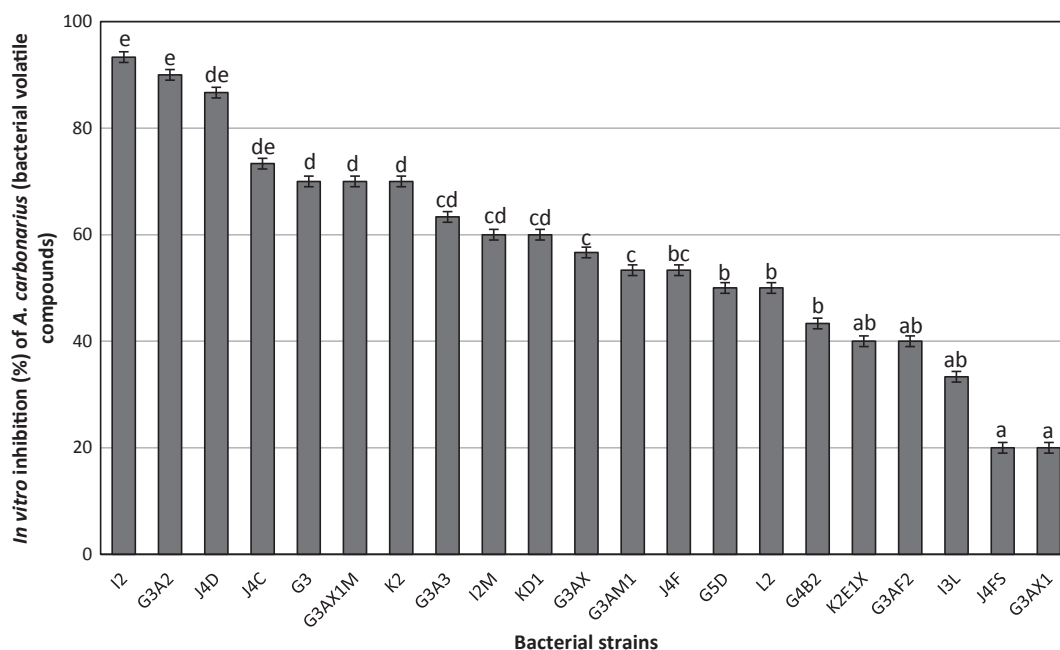


Fig. 4. Effect of the bacterial volatile compounds, using the double plate technique, on the growth of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. Mean values (3 replicates) sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis’ non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P < 0.05$.

strain. On unwounded berries, only 5 out of the 21 strains tested significantly reduced *A. ochraceus* rot symptoms. The highest inhibition level was 12%. Five strains (I3L, L2, G3AF2, J4C and J4F) tended to increase *A. ochraceus* symptoms on unwounded fruit (this was not significant at $P = 0.05$ compared to the corresponding untreated control UC).

4. Discussion

The aim of this study was to isolate efficient bacterial inoculants having the ability to control or at least to reduce the pernicious effects of two ochratoxigenic pathogens on grapevine berries, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius*. To our knowledge, this is the first

report describing by molecular, microbiological and biochemical approaches rhizobacterial strains that inhabit the soils of organic and conventional Tunisian vineyards, some of these being endowed with antagonistic abilities.

The molecular characterization of the sampled bacteria was performed by 16S rDNA sequencing and showed that these isolates belonged to the genera *Bacillus* (35 strains), *Brevibacterium* (1 *B. frigoritolerans* and 1 *B. halotolerans*), *Microbacterium* (1 *M. oxydans*) and *Paenibacillus* sp. (1 strain). As some strains of *Bacillus* spp. could not be identified based on the 16S rDNA gene, sequencing of the *rpoB* gene was undertaken leading to the identification of 11 *Bacillus* species: *B. velezensis* (7 strains), *B. amyloliquefaciens* (6 strains), *B. endophyticus* (4 strains), *B. safensis* (4 strains), *B. pumilus* (3 strains), *B. subtilis* (2

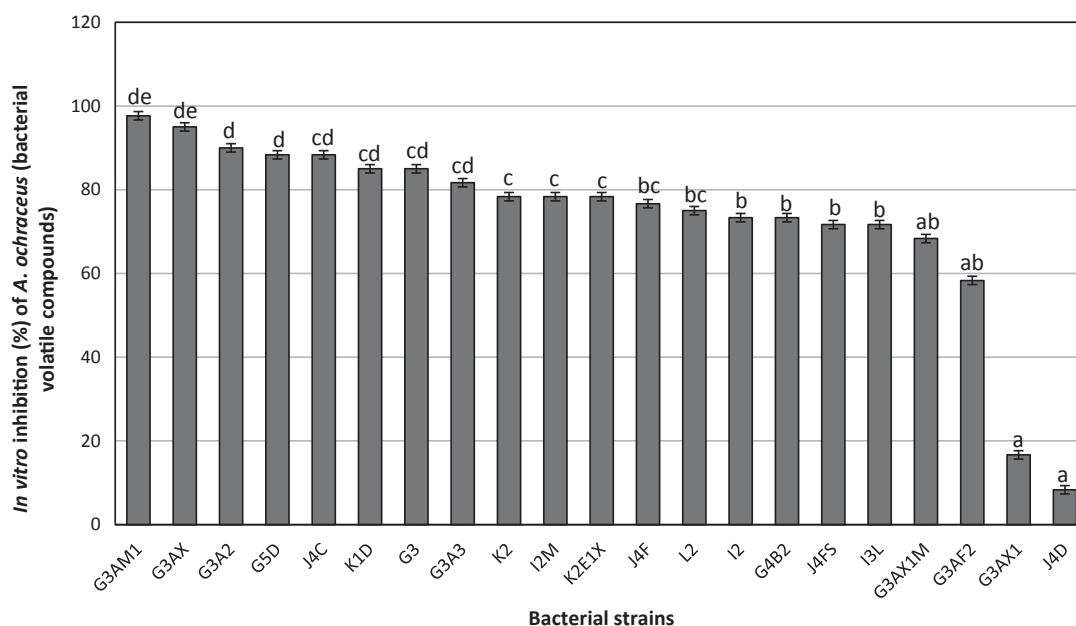


Fig. 5. Effect of the bacterial volatiles compounds, using the double plate technique, on the growth of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus ochraceus*. Mean values (3 replicates) sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis’ non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P < 0.05$.

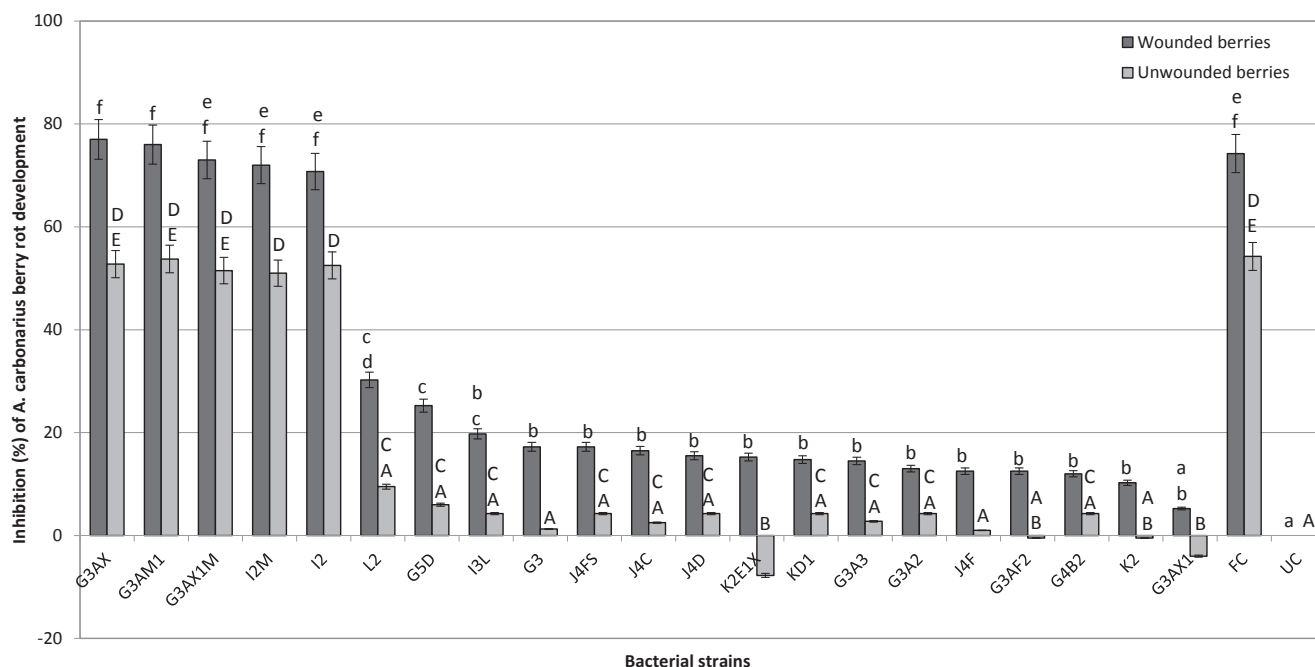


Fig. 6. Effect of the rhizobacterial isolates on the rot development of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius* on wounded (dark grey bars) and unwounded (light grey bars) berries. Mean values (20 replicates) sharing the same uppercase or lowercase letters are not significantly different according to the Tukey test after ANOVA at $P < 0.05$ (one ANOVA per type of berries, wounded or unwounded). UUC: Untreated Uninoculated Control, UC: Untreated Control (i.e. *A. carbonarius* only), MC: Medium Control (i.e. sterile LB medium), FC: Fungicide Control (i.e. fluazinam).

strains), *B. thuringiensis* (2 strains), *B. cereus* (1 strain), *B. mojavensis* (1 strain), *B. simplex* (1 strain) and *B. weihenstephanensis* (1 strain) (Table 2). Some of those are described in the literature as frequent and common colonizers of grapevine organs and tissues, i.e. flowers, berries, leaves, seeds, roots and vessels (Compant et al., 2011; Marasco et al., 2013; Pinto et al., 2014; Rezgui et al., 2016; West et al., 2010).

It is known that microorganisms associated with plants, in particular *Bacillus* spp., can promote their growth and development through

a number of mechanisms, among which the growth inhibition of phytopathogenic microorganisms (Beneduzi et al., 2012; Choudhary and Johri (2009)). Our results support these previous reports by showing that the bacterial strains inhabiting the soils of Tunisian vineyards possess antagonistic traits, i.e. antibiotics encoding genes, production of siderophores, metabolization of carbon sources, and plant growth promoting traits, i.e. solubilisation of phosphate.

All the isolated *Bacillus* spp. strains expressed differentially at least

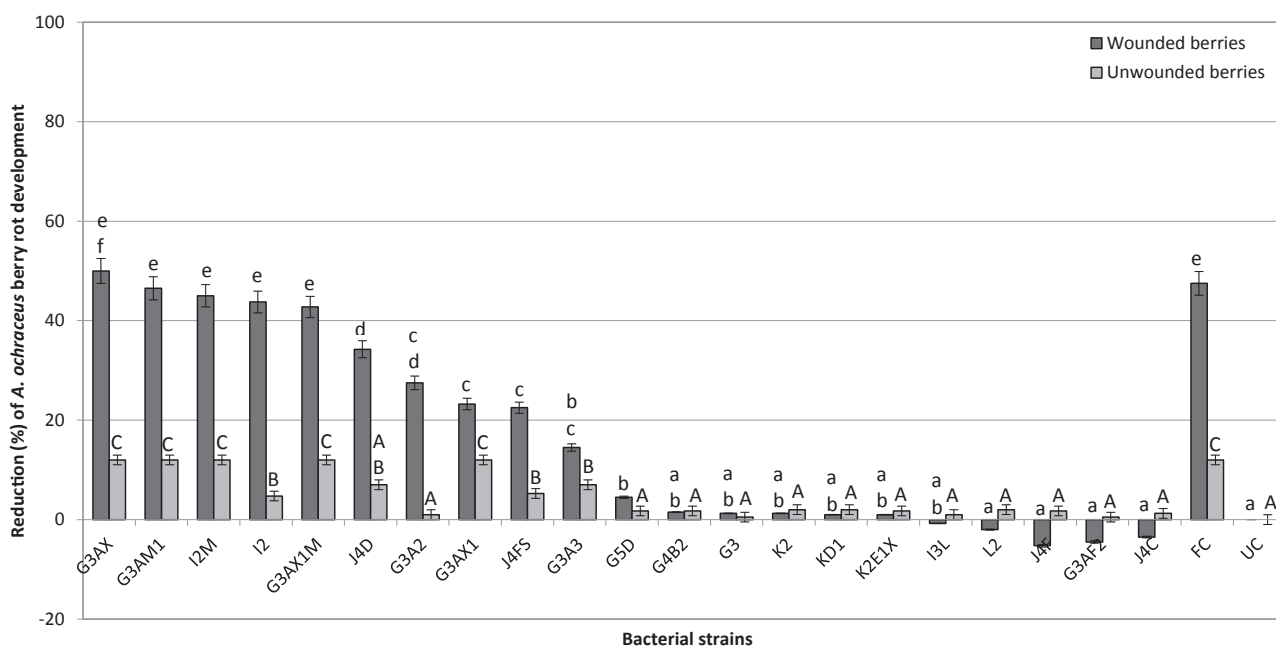


Fig. 7. Effect of the rhizobacterial isolates on the rot development of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus ochraceus* on wounded (dark grey bars) and unwounded (light grey bars) berries. Mean values (20 replicates) sharing the same uppercase or lowercase letters are not significantly different according to the Tukey test after ANOVA at $P < 0.05$ (one ANOVA per type of berries, wounded or unwounded). UUC: Untreated Uninoculated Control, UC: Untreated Control (i.e. *A. ochraceus* only), MC: Medium Control (i.e. sterile LB medium), FC: Fungicide Control (i.e. fluazinam).

one of the 5 antibiotic genes investigated (4 fengycins and 1 bacillo-mycin), with only three strains of *Bacillus*, i.e. *Bacillus* sp. G3AM1, *B. mojavensis* G4B2 and *B. subtilis* G4A1, having the 5 encoding genes. Iturine (bacillomycine) and fengycin families were reported to have a strong *in vitro* antifungal action against a wide variety of yeasts and fungi (Li et al., 2016). Fengycins are biologically active lipopeptides produced by several *Bacillus subtilis* strains, known to develop antifungal activity against filamentous fungi likely by making the plasma membrane of the target cell more permeable (Deleu et al., 2008; Jourdan et al., 2009).

Many reports indicated that several antifungal mechanisms of *Bacillus* species contribute to phytopathogen antagonism, as siderophores, which are important natural iron chelators representing a novel class of antibiotics with considerable therapeutic potential (Pluhacek et al., 2016). Our results indicated that all the isolated bacteria produced siderophores; the most productive was the *Brevibacterium frigoritolerans* strain KD1 (Table 2). Strains from this genus are frequently reported as siderophore producers, as shown by Noordman et al. (2006) and Pham et al. (2017).

The metabolism of the bacterial strains isolated from two Tunisian vineyards was also studied with the method of Biolog Ecoplate. The results showed that the rhizobacteria metabolized carbon sources in the same way, but metabolized differently carbohydrates and amino acids depending on the farming system, i.e. organic or conventional (47.2% of the total variability; Fig. 1). In the same context, Rezgui et al. (2016) reported that the carbohydrates group was the most intensively metabolized by their 19 strains, with *Pantoea agglomerans* being the highest metabolizer.

Regarding the solubilization of phosphates, previous studies (Kang et al., 2014; Matos et al., 2017) showed that *Bacillus* strains, e.g. *B. pumilus* and *B. megaterium*, exhibited a strong ability to solubilize phosphates. In this study, of the 39 isolates assessed, only 3 strains belonging to the genus *Bacillus* were able to do this in very small amounts: *B. pumilus* (G3AX), *B. velezensis* (G3AX1M) and *Bacillus* sp. (K2E1X). Phosphorus is, after nitrogen, the second important key element as a mineral nutrient in terms of quantitative plant requirement. It plays significant role in increasing root ramification and strength by imparting vitality and disease resistance capacity to plant (Sharma et al., 2013).

Based on the criteria described above, 21 strains were selected for *in vitro* experiments to test their ability as fungal antagonists against two common pathogens of table grapes causing black rot and OTA contamination in grapes, i.e. *A. carbonarius* and *A. ochraceus* (Allam et al., 2011; Atoui et al., 2006; Leong et al., 2008; Magnoli et al., 2003).

In the direct confrontation tests, the largest zones of inhibition of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* were respectively obtained with *B. pumilus* strain G3AX (81% inhibition, Fig. 2) and *B. amyloliquefaciens* strain I2 (85% inhibition, Fig. 3). Similar results were observed concerning the inhibition of different pathogens by *Bacillus* strains both *in vitro* and *in vivo* (Gordillo et al., 2009; Haidar et al., 2016; Rezgui et al., 2016). In particular, *B. pumilus* and *B. amyloliquefaciens* were reported as being successful in controlling respectively *Fusarium* wilt on tomatoes with beneficial effect on plant growth (Heidarzadeh and Ravari, 2015); and soft and brown rots caused by *Erwinia carotovora* and *Monilinia fructicola* on vegetables and stone fruits (Liu et al., 2011; Zhao et al., 2013).

Furthermore, *Bacillus* and *Paenibacillus* species were shown to exhibit antibacterial and/or antifungal activity through the emission of volatile organic compounds (VOCs) (Berrada et al., 2012; Cernava, 2012; Rybakova et al., 2015). Several VOCs can reduce fungal growth, impair fungal spores and hyphae, and/or promote plant growth (Kai et al., 2007; Weiskopf, 2013). In our study, all the bacterial strains produced VOCs: the greatest mycelial inhibitions were observed with *B. amyloliquefaciens* strain I2 and *Bacillus* sp. G3AM1 against *A. carbonarius* (93% inhibition, Fig. 4) and *A. ochraceus* respectively (97% inhibition, Fig. 5).

Berry rot, known as Aspergillus rot or black rot, is caused by

Aspergilli whose presence is very common in vineyards (Bejaoui et al., 2006; Perrone et al., 2006; Tsitsigiannis et al., 2012). In order thus to directly observe the antagonistic effect of our 21 bacterial strains on such ochratoxinogenic pathogens, we carried out experiments on wounded and unwounded grape berries. These comparative *in vivo* screening tests showed clear differences in the ranking of the efficacy of bacterial strains against both fungal pathogens, i.e. *A. carbonarius* and *A. ochraceus*, depended on the pathogen considered and on the presence or absence of wounds at the fruit surface.

In our biotests, results of pathogenicity were positive in 100% of the cases; all the berries (wounded or not) inoculated developed rot symptoms. However, the overall rot severity was lower when *A. ochraceus* was inoculated and when unwounded berries were used. The degree of virulence of *A. carbonarius* was 77% on wounded berries and 54% on unwounded berries (Fig. 6). Concerning *A. ochraceus*, its virulence was lower, i.e. 51% and 12% respectively for wounded and unwounded berries (Fig. 7). Such differences in the degree of infection between wounded and unwounded berries might be explained by the fact that *Aspergillus* spp. infect grape berries through wounds, confirming the report of Onivins (2005) observing that burst berries by water supply after a dry period are very favorable to the development of pathogenic fungi, as well as wounds caused by insects, birds, hail, stalk dehydration, advanced maturity. Berry wounds may also provide nutrients that are likely required by phytopathogenic fungi for initiating the pathogenic process (Haidar et al., 2016; Onivins, 2005).

On wounded berries, 5 strains provided important levels of protection greater than 70% for *A. carbonarius* and 42% for *A. ochraceus*: *B. pumilus* G3AX, *Bacillus* sp. G3AM1, *B. velezensis* G3AX1M and I2M, and *B. amyloliquefaciens* I2 (Figs. 6 and 7). On unwounded berries, those same five strains revealed lower levels of inhibition; they were slightly higher than 50% with *A. carbonarius*, but they did not exceed 12% with *A. ochraceus*. Similarly to fungal pathogenic processes that likely require specific nutrients to be initiated, differences in nutrient availability between wounded and unwounded grape berries might be the main factor accounting for the differences in the antagonistic effects of the tested bacterial strains on grape berries. Despite such inhibitory differences, these bioassays confirmed the efficacy of *Bacillus* strains in controlling pathogenic fungi on different plant hosts (Heidarzadeh and Ravari, 2015; Mardanova et al., 2017; Palazzini et al., 2016; Pantelides et al., 2015; Tsitsigiannis et al., 2012; Yuan et al., 2012). Indeed, in our bioassays, in the presence of the bacterial strains, the disease incidence was null and/or the lesions induced by both pathogenic *Aspergilli* disappeared or were reduced even if the antagonistic effects were different depending on the ochratoxinogenic fungus considered. As an example, the *B. amyloliquefaciens* strain L2 reduced *A. carbonarius* mycelial growth by 30% but increased *A. ochraceus* virulence by 2% on wounded grape berries (Figs. 6 and 7). Moreover, we observed for the first time that two strains, i.e. *Bacillus* sp. K2E1X and *B. velezensis* G3AX1, increased *A. carbonarius* virulence on unwounded grape berries while five strains, i.e. *Paenibacillus* sp. I3L, *B. amyloliquefaciens* L2 and J4C, *B. thuringiensis* J4F and *Microbacterium oxydans* G3AF2, increased the one of *A. ochraceus* on wounded berries. Haidar et al. (2016) observed similar phenomena with strains of *B. pumilus* and *Xanthomonas* sp. in berry biocontrol assays of *Botrytis cinerea*.

In accordance with the *in vitro* tests, i.e. direct confrontations and volatils, *B. pumilus* strain G3AX was the most effective strain in controlling both ochratoxinogenic *Aspergilli*. The same strain reduced the levels of rot expression by 77% and 53% for *A. carbonarius*, and by 50% and 12% for *A. ochraceus*, respectively on wounded and unwounded berries.

5. Conclusions

The present study showed that various bacterial strains colonize the rhizosphere of Tunisian vineyards. Our results demonstrate that *B. pumilus* strain G3AX has great potential as a biocontrol agent against

Aspergillus diseases on grapevine. Further research should be carried out in the vineyards to test the ability of that strain, but also of other isolated bacteria that have excellent antagonist activity (*Bacillus* spp. G3AM1 and *Bacillus velezensis* I2M), to control infections by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* and other fungi involved in grape berry rots. The better protection results on grape berries could be obtained as a surface treatment before or/and during grape storage period when fruits were immersed in a liquid culture containing strong antagonistic bacteria to avoid disease caused by *Aspergillus* spp..

CRedit authorship contribution statement

Mayssa Arfaoui: Investigation, Methodology, Formal analysis, Software, Writing - original draft. **Jessica Vallance:** Conceptualization, Formal analysis, Validation, Supervision, Writing - review & editing. **Emilie Bruez:** Resources, Formal analysis. **Awatef Rezgui:** Methodology, Resources. **Imen Melki:** Resources. **Samir Chebil:** Conceptualization, Resources. **Najla Sadfi-Zouaoui:** Supervision, Funding acquisition, Project administration. **Patrice Rey:** Supervision, Funding acquisition, Project administration.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from French Ministry in charge of Agriculture (Casdar program V1302) and Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (alternation scholarship). The authors are grateful to Marc Fermaud, Thomas Gautier, Carlos Calvo-Garrido and Rana Haidar for their help on Ecoplate test and bioassays on grape berries. We are also indebted to the INRA UMR-SAVE technical staff, Gilles Taris, Olivier Bonnard and Jean Roudet, for their valuable help for laboratory experiments. The authors also thank the reviewers for helpful comments to improve the manuscript.

References

- Agricultural Statistics Analysis (ASA), 2016. Ministry of Agriculture, Republic of Tunisia.
- Aksoy, U., Eltem, R., Meyvaci, K.B., Altindisli, A., Karabat, S., 2007. Five-year survey of ochratoxin A in processed sultanas from Turkey. *Food Addit. Contam.* 24, 292–296. <https://doi.org/10.1080/02652030601039021>.
- Allam, N.G., El-Shanshoury, A.E.R.R., Emara, H.A., Zaky, A.Z., 2011. Biological activity of *Streptomyces noursei* against ochratoxin A producing *Aspergillus niger*. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 666–677. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2133>.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E., 2011. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112, 159–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>.
- Atoui, A., Dao, H.P., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2006. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular Nutr. Food Res.* 50, 488–493. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500165>.
- Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. In: Logrieco, A., Bailey, J.A., Corazza, L., Cooke, B.M. (Eds.), *Mycotoxins in Plant Disease*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0001-7_5.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 203–208. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00073.x>.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): the potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1044–1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>.
- Berrada, I., Benkhemmar, O., Swings, J., Bendaou, N., Amar, M., 2012. Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. Retrieved from. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 625–630. <http://www.jstor.org/stable/43872349>.
- Bressan, W., 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *Biocontrol* 48, 233–240. <https://doi.org/10.1023/A:1022673226324>.
- Cernava, T., 2012. Identification of Volatile Organic Compounds from Plant-Associated Bacteria. Master Thesis. Graz University of Technology.
- Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Scuderi, G., Scortichini, M., 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *J. Phytopathol.* 153, 654–666. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01033.x>.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* 164, 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangel, H., Sessitsch, A., 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* 62, 188–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>.
- De Costa, P., Bezerra, P., 2009. *Fungicides: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Nova Biomedical, New York.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2008. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* 94, 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.
- Déniel, F., Rey, P., Chérif, M., Guillou, A., Tirilly, Y., 2004. Indigenous bacteria with antagonistic and plant-growth promoting activities improve slow-filtration efficiency in soilless culture. *Can. J. Microbiol.* 50, 499–508. <https://doi.org/10.1139/w04-034>.
- Dimkic, I., Zivkovic, S., Beric, T., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Stankovic, S., Fira, Dj, 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Control.* 65, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012>.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>.
- Commission, European, 2013. Commission Regulation (EU) No 212/2013 of 11 March 2013 replacing Annex I to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards additions and modifications with respect to the products covered by that Annex Text with EEA relevance. *Official J. Eur. Union.* 68, 30–52.
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A., Creppy, E.E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit. Contam.* 18, 565–568. <https://doi.org/10.1080/02652030117365>.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole carbon-source-utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.
- Gordillo, M.A., Navarro, A.R., Benitez, L.M., De Plaza, M.I.T., Maldonado, M.C., 2009. Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp. Strain IBA 33. *Microbiol. Insights.* 2, 15–24. <https://doi.org/10.4137/MBI.S995>.
- Haidar, R., Roudet, J., Bonnard, O., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Fert, M., Gautier, T., Deschamps, A., Fermaud, M., 2016. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeoaniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiol. Res.* 192, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.003>.
- Heidazadeh, N., Ravari, S.B., 2015. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato. *Arch. Phytopathology Plant Protect.* 48, 13–16. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1140611>.
- Insam, H., Goberna, M., 2004. Use of Biolog® for Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd Ed. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 853–860.
- International Organization of Vine and Wine (OIV). 2016. State of the world wine sector.
- Interprofessional Grouping of Fruits (GIFRUIT). 2016. Manual of good agricultural practices. Table grape. Ministry of Agriculture, Republic of Tunisia.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P., Ongena, M., 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 456–468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187, 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>.
- Kang, S.M., Radhakrishnan, R., You, Y.H., Joo, G.J., Lee, I.J., Lee, K.E., Kim, J.H., 2014. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mJ1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian J. Microbiol.* 54, 427–433. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0476-6>.
- Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., Johri, B.N., 2012. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A₅F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Basic Microbiol.* 52, 670–678. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100463>.
- Leong, S., Hocking, A.D., Pitt, J.I., 2008. Occurrence of fruit rots fungi (*Aspergillus* section Nigri) on some drying varieties of irrigated grape. *Aust. J. Grape and Wine Res.* 10, 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00010.x>.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., Liao, X., 2016. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS One* 11, e0162125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>.
- Lin, G.H., Chen, C.L., Tschen, J.S.M., Tsay, S.S., Chang, Y.S., Liu, A.T., 1998. Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene fenB from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 1338–1341.
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X., Wu, H., Liu, W., Gao, X., 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20, 43–52. <https://doi.org/10.1159/000323501>.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcerio, A., 2003. Mycoflora and ochratoxin producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina.

- Letters Appl. Microbiol. 37, 179–184. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01376.x>.
- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El-Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C., Daffonchio, D., 2013. Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *BioMed. Res. Int.* ID 491091. <https://doi.org/10.1155/2013/491091>.
- Mardanova, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnullina, L.F., Gilyazeva, A.G., Bogomolnaya, L.M., Sharipova, M.R., 2017. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agric. Sci.* 8, 1–20. <https://doi.org/10.4236/as.2017.81001>.
- Matos, A.D.M., Gomes, I.C.P., Nietsche, S., Xavier, A.A., Gomes, W.S., Dos Santos Neto, J.A., Pereira, M.C.T., 2017. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89, 2945–2954 Epub September 04, 2017. <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>.
- Mie, A., Andersen, H.R., Gunnarsson, S., Kahl, J., Kesse-Guyot, E., Rembiakowska, E., Quaglio, G., Grandjean, P., 2017. Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review. *Environ. Health* 16, 111. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0315-4>.
- Munimbazi, C., Saxena, J., Tsai, W.Y.J., Bullerman, L.B., 1997. Inhibition of production of cyclopiiazonic acid and ochratoxin A by the fungicide iprodione. *J. Food Prot.* 60, 849–852. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.7.849>.
- Noordman, W.H., Reissbrodt, R., Bongers, R.S., Rademaker, J.L., Bockelmann, W., Smit, G., 2006. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *J. Appl. Microbiol.* 101, 637–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02928.x>.
- Nunes, C., Usall, J., Teixid, N., Fons, E., Vinas, I., 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden delicious apples. *J. Appl. Microbiol.* 92, 247–255. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01524.x>.
- Office National Interprofessionnel des Vins (ONIVINS). 2005. Maîtrise des teneurs en OTA au vignoble.
- Ospital, M., Cazabeil, I.M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E., Medina, B., 1998. L'ochratoxine A dans le vin. *Revue Française d'Oenologie* 169, 16–18.
- Palazzini, J.M., Dunlap, C.A., Bowman, M.J., Chulze, S.N., 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiol. Res.* 192, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>.
- Pantelides, S.I., Christou, O., Tsolakidou, M.-D., Tsaltas, D., Ioannou, N., 2015. Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biol. Control.* 88, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.021>.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Appl. Env. Microbiol.* 72, 680–685. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.680-685.2006>.
- Pham, N.P., Layec, S., Dugat-Bony, E., Vidal, M., Irlinger, F., Monnet, C., 2017. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics* 18, 955. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4322-1>.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One* 9, e85622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085622>.
- Pluhacek, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novak, J., Havlicek, V., 2016. Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 35, 35–47. <https://doi.org/10.1002/mas.21461>.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W.G., Xuewen, G., De Kievit, T., 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can. J. Microbiol.* 53, 901–911. <https://doi.org/10.1139/W07-049>.
- Ren, J.J., Shi, G.L., Wang, X.Q., Liu, J.G., Wang, Y.N., 2013. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 2343–2352. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1401-6>.
- Rezgui, A., Ben Ghnaya-Chakroun, A., Vallance, J., Bruez, E., Hajlaoui, M.R., Sadfi-Zouaoui, N., Rey, P., 2016. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biol. Control.* 99, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.005>.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., Borriess, R., 2011. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J. Biotechnol.* 155, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.006>.
- Rybakova, D., Cernava, T., Köberl, M., Liebming, S., Etemadi, M., Berg, G., 2015. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant Soil.* 1, 125–140. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2526-1>.
- Schwyn, B., Neillands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Sharma, B.S., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, A.T., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.
- Somma, S., Perrone, G., Logrieco, A.F., 2012. Diversity of black Aspergini and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. Retrieved from. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 131–147. <http://www.jstor.org/stable/43872362>.
- Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C., 2012. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. Retrieved from. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 158–174. <http://www.jstor.org/stable/43872364>.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit. Contam.* 25, 193–202. <https://doi.org/10.1080/02652030701744546>.
- Weisskopf, L., 2013. The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex Research Center, Spain, pp. 1352–1363.
- West, E.R., Cothier, E.J., Steel, C.G., Ash, G.J., 2010. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can. J. Microbiol.* 56, 209–216. <https://doi.org/10.1139/W10-004>.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 425–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.002233>.
- Whipps, J.M., 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.* 107, 127–142. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04887.x>.
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955–963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5).
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl. Env. Microbiol.* 78, 5942–5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>.
- Zhao, Y., Li, P., Huang, Y., 2013. Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. *World J. Microbiol. Biochem.* 29, 411–420. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1193-0>.
- Zhou, T., Northover, J., Schneider, K.E., 1999. Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Plant Pathol.* 21, 375–381. <https://doi.org/10.1080/07060669909501174>.
- Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13, 655–668. <https://doi.org/10.1080/02652039609374451>.

Valorisation des résultats
Congrès et actes de congrès

**10th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Reims, France, 4-7 Juillet 2017
(communication orale)**

Different antifungal effects of *Bacillus subtilis* and *Pantoea agglomerans* on cv. Cabernet Sauvignon and cv. Muscat d'Italie, two grapevines cultivars against two Grapevine Trunk Diseases (GTDs) pathogens, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. AWATEF REZGUI^{1,2}, JESSICA VALLANCE^{2,3}, ASMA BEN GHNAYA CHAKROUN¹, EMILIE BRUEZ^{2,3}, MAYSSA ARFAOUI^{1,2}, NAJLA SADFI ZOUAOUI¹ and PATRICE REY^{2,3}. ¹ *Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092, Tunisia.* ² *INRA, UMR 1065 Santé et Agro-écologie du Vignoble (SAVE), ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France.* ³ *Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1065 SAVE, 33140 Villenave d'Ornon, France.*

Email: foufarezqui07@gmail.com

Summary. Biological control against *Phaeomoniella chlamydospora* and *Neofusicoccum parvum*, two pathogens, commonly associated with esca and brown wood-streaking of grapevine, has been carried out on grapevines cultivars, Muscat d'Italie and Cabernet Sauvignon. The two fungi were inoculated through wounds in the trunks of the two cultivars, either single or in combination with bacterial strains with potential biocontrol activity, *Bacillus subtilis* « B6 » or *Pantoea agglomerans* « S5 » or « B6+S5 ». Depending on the pathogen and the cultivar used, the severity of internal symptoms, assessed as length of necrosis infected wood, varied. Grapevines from Cabernet Sauvignon were more susceptible to *P. chlamydospora* attacks than grapevines from Muscat d'Italie; but, no differences were obtained with *N. parvum* attacks on the two cultivars. In term of plant protection, the most efficient condition to reduce *in planta* necrosis caused by the pathogens in the two cultivars was the combination of the two bacteria. However, bacterial treatments were significantly more efficient to reduce necrosis caused by *N. parvum* and/or *P. chlamydospora* in Muscat d'Italie than in Cabernet Sauvignon.

Antifungal effects of *Bacillus subtilis* and *Pantoea agglomerans* on grapevines cv. Cabernet Sauvignon and Italia against two GTD pathogens, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeomoniella chlamydospora*.

AWATEF REZGUI^{1,2}, ASMA BEN GHAYYA CHAKROUN¹, EMILIE BRUEZ^{2,3}, MAYSSA ARFAOUI^{1,2}, AMIRA YACOUB², MOKHTAR DRIDI¹, NAJLA SADFI ZOUAOU¹, PATRICE REY^{2,3} and JESSICA VALLANCE^{2,3}.

¹Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092, Tunisia. ²INRA, UMR1065 Santé et Agro-écologie du Vignoble (SAVE), ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France. ³Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, UMR1065 SAVE, 33140 Villenave d'Ornon, France
E-mail: amira.yacoub@inra.fr

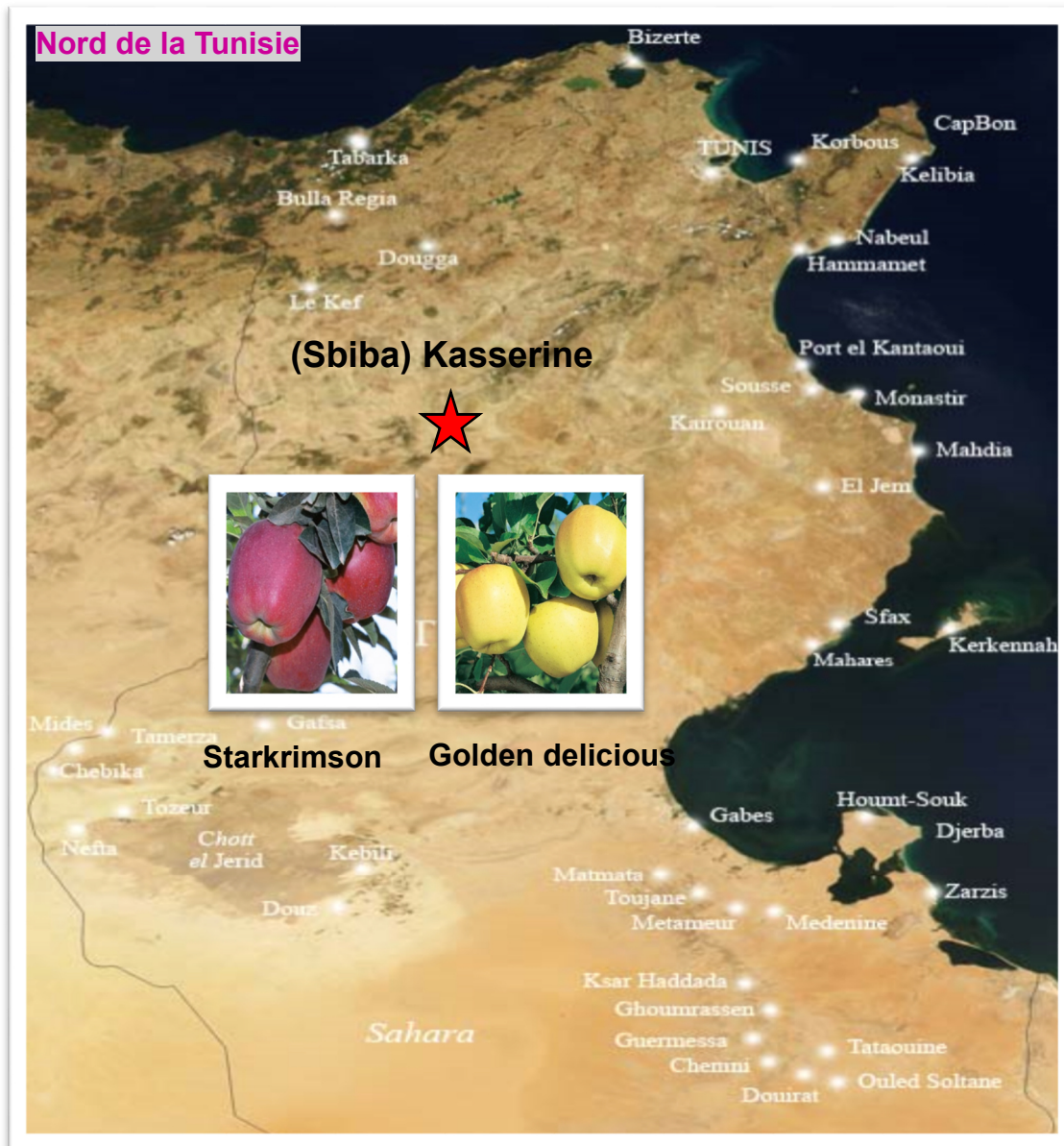
In Tunisia, knowledge about the symptoms of Grapevine trunk diseases (GTDs) and the microflora associated with, is still incomplete despite their ability to cause considerable damage to vineyards. In that context, the fungal microflora inhabiting the wood tissues of Tunisian GTD-foliar symptomatic vines was studied in order to identify the pathogens responsible for wood decay. Microbiological isolations and sequencing of the ITS region allowed us to identify for the first time in Tunisia, 3 fungi described in the literature as involved in GTDs: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*. Their pathogenicity was confirmed *in planta*, and *in vivo* and *in planta* competitions between strains were noticed. Then, the bacterial microflora colonizing the non-necrotic and necrotic wood tissues of Tunisian mature grapevines was investigated in order to find a suitable Biological Control Agent (BCA) that can be applied to the Tunisia conditions. The 19 most abundant cultivable strains, selected based on their morphology, were assigned to *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium* and *Bacillus* species based on the 16S rRNA and *rpoB* genes. Microbiological and molecular screenings revealed that those 19 strains had an *in vitro* antagonistic effect against the 3 fungal pathogens previously isolated, with *B. subtilis* B6 being the most promising BCA. Finally, the efficacy of *Bacillus subtilis* B6, isolated from a Tunisian vine (cv. Italia); *Pantoea agglomerans* S5, originated from a French vine (cv. Cabernet Sauvignon); and the combination B6+S5, was investigated in controlling *N. parvum* (Tunisian strain) and *Phaeomoniella chlamydospora* (French strain) in young vines cvs. Italia and Cabernet Sauvignon. Depending on the pathogen and the cv. used, the severity of internal symptoms (necrosis length) varied. In terms of plant protection, the most efficient BCA to reduce *in planta* necrosis caused by the pathogens in both cvs was the combination of the two B6+S5 bacteria.

Annexes

Annexe 1



Annexe 2



Annexe 3

