



NEWSLETTER

N° 5 - Septembre 2023

Bulletin d'information par le projet Prometeo cofinancé par l'Union Européenne par le biais du Programme IEV de Coopération Transfrontalière "Italie-Tunisie" 2014-2020

Le Programme IEV CT "Italie-Tunisie" 2014-2020 est un programme bilatéral de coopération transfrontalière cofinancé par l'Union Européenne dans le cadre de l'Instrument Européen de Voisinage de partenariat (IEV). Avec une allocation financière de 33,3 millions d'euros, le programme - dont la gestion commune a été confiée au bureau de la Programmation de la Région Sicile - a pour but d'encourager un développement économique, social et territorial juste, équitable et durable, en vue de favoriser l'intégration transfrontalière et de valoriser les territoires et les atouts des deux Pays participants. <https://www.italietunisie.eu/>

Résumé du bulletin d'information:

Protocoles scientifiques en Pathologie Végétale:

Moisissures bleues et vertes
d'agrumesp.2

Pourriture des racines et du
collet de l'amandierp.4

Pourriture racinaire et du collet
de l'olivierp.7

Protocoles scientifiques en Science des Matériaux:

Analyse des tissus végétaux par
spectrométrie de masse des ions
secondaires à temps de volp.10

Extraction de substances
naturelles à activité biologique
provenant des sous-produits de
l'agriculturep.14

ÉDITION SPÉCIALE: PROTOCOLES DE PATHOLOGIE VÉGÉTALE ET DE SCIENCE DES MATÉRIAUX DU PROJET PROMETEO

Avec ce numéro spécial, la publication des protocoles scientifiques du projet Prometeo est terminée. Dans cette Newsletter, un espace est dédié aux protocoles scientifiques de pathologie végétale et de science des matériaux.

Pendant les mois de juillet, août et septembre, l'expérimentation sur le terrain et la validation des protocoles se sont poursuivies, et les résultats obtenus fourniront une base scientifique solide pour orienter les politiques agricoles, renforcer les services phytosanitaires, accroître l'efficacité de la production, la compétitivité et la durabilité de ces secteurs et améliorer les normes de qualité en matière de sécurité alimentaire.

Bonne lecture!

Moisissures bleues et vertes d'agrumes-*Penicillium digitatum* et *P. italicum*

Les «moisissures vertes et bleues» causées par *Penicillium digitatum* et *P. italicum* (famille des *Trichocomaceae*) sont les maladies post-récolte les plus destructrices des agrumes. La distribution géographique de ces deux espèces comprend toutes les zones de production d'agrumes dans le monde et elles ont également été décrites dans des pays qui n'importent que des agrumes et n'en produisent pas (Frisvad et Samson 2004). *Penicillium digitatum* et *P. italicum* sont tous deux des pathogènes des plaies strictes qui infectent les fruits par le biais de blessures de la peau produites dans le champ, dans l'atelier d'emballage ou au cours de la chaîne de commercialisation des fruits (Bautista-Baños 2014 ; Palou 2014). *Penicillium digitatum* est le pathogène le plus grave et le plus répandu et est considéré comme la principale cause de pertes économiques en citriculture, entraînant 90 % du total des pertes post-récolte des agrumes (Costa et al. 2009). *Penicillium italicum*, par contre, est plus commun dans les fruits conservés en chambre froide pendant l'été et il peut se propager dans les cartons emballés plus facilement que la moisissure verte, provoquant un "nid" de fruits pourris (Ismail et Zhang 2004). Des connaissances actualisées sur l'étiologie des maladies, en particulier sur les aspects liés aux mécanismes d'infection et aux conditions environnementales favorisant le développement du pathogène, pourraient être utiles pour planifier des stratégies de gestion «intelligentes». À cet égard, l'adoption d'exigences minimales telles que la mise en œuvre d'une meilleure manipulation post-récolte, l'assainissement de l'équipement, le transport et les conditions de stockage (Naqvi 2006), pourrait représenter des mesures nécessaires et suffisantes pour sauvegarder le rendement et, en même temps, garantir la sécurité de l'environnement et de la santé humaine.

1. Diagnostic

1.1. Sur le terrain - symptômes et signes

Aux premiers stades, les infections des plaies de *P. digitatum* à l'origine de la détérioration des fruits développent une zone molle sur la peau du fruit autour de la plaie. Les températures chaudes favorisent le développement d'un mycélium blanc sur la zone molle et, peu après, la production de spores de couleur verte. L'infection progresse rapidement et, en l'espace de quelques jours, le fruit entier, totalement moulé et couvert de conidies vertes, commence à rétrécir et, s'il est exposé à l'air, devient une masse visqueuse et informe. Les lésions initiales de *P. italicum* sont similaires aux lésions causées par *P. digitatum*, mais les spores sont de couleur bleue et la zone de l'écorce d'agrumes où elles apparaissent est typiquement entourée d'une étroite bande de mycélium blanc se développant sur l'écorce imbibée d'eau. Avec le temps, toute la surface du fruit est entièrement recouverte de spores ; le fruit commence alors à rétrécir et, s'il est exposé à l'air, devient une masse visqueuse et informe.



Fig.1- Fruits orange affectés par les moisissures vertes (*Penicillium digitatum*) et bleues (*P. italicum*). En bas à gauche, cultures de 7 jours de l'isolat de *P. digitatum* (à gauche) et de *P. italicum* (à droite) sur milieu PDA à 25°C.

1.2. En laboratoire - isolement, caractéristiques des cultures et identification moléculaire du pathogène

Penicillium spp. peut être isolé en plaçant un fragment de 5 mm d'écorce d'agrumes infectée par *Penicillium*, excisé à partir de la marge de la zone de croissance en progression, désinfecté avec 1% de NaClO pendant 2 minutes, rincé dans de l'eau distillée stérile, et placé sur de la gélose au dextrose de pomme de terre (PDA) amendée avec du sulfate de streptomycine à la concentration de 0,25 g/L. Après 24 heures d'incubation à 25°C dans l'obscurité, les colonies en croissance sont transférées sur PDA. Les cultures pures sont obtenues par transfert mono-hypha. Les caractéristiques macroscopiques peuvent être étudiées sur Czapek yeast autolysate agar (CYA), sucrose yeast extract agar (YES), malt extract agar (MEA) et potato dextrose agar (PDA) (Samson et al., 2014 ; Visagie et al., 2014). Ces caractéristiques comprennent : la taille des colonies, la couleur des colonies à l'avant et à l'arrière, l'apparence et le degré de sporulation. La couleur, la texture et la forme des colonies peuvent varier d'une espèce à l'autre. Les colonies de *P. digitatum* se caractérisent, à l'avant, par une couleur vert olive et, à l'arrière, par une couleur incolore à jaune crème ou brun terne pâle. Les colonies de *P. italicum* sont au contraire planes, fortement sporulantes, de couleur bleue ou gris-vert et paraissent souvent granuleuses en raison de la présence de faisceaux de conidiophores et de têtes conidiennes. Le revers est incolore ou gris à jaune-brun, bien qu'il puisse tourner à l'orange brunâtre ou au rouge-brun. Les observations microscopiques sont effectuées à partir de 7 à 10 cultures anciennes à l'aide d'un microscope optique (Leica). Ces observations concernent la longueur des phialides, des métules et des stipes, la longueur et la largeur des conidies et le type de structure des pénicillaires.

L'identité du pathogène est confirmée par PCR traditionnelle par l'amplification de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique nucléaire (ADNr), en utilisant les paires d'amorces universelles ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGC-3') et ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), (White et al., 1990). Les produits PCR sont purifiés à l'aide d'une colonne de purification PCR (Macherey-Nagel) et envoyés pour séquençage. Les séquences ont été comparées à l'aide du programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2. Gestion

La gestion traditionnelle de cette maladie implique des actions spécifiques qui commencent dans le champ et se poursuivent jusqu'au stade du stockage dans l'entrepôt. Les mesures post-récolte typiques comprennent le trempage avec des composés d'assainissement, tels que le chlore ou récemment l'acide peroxyacétique (Ismail et Zhang, l.c.). Les fruits transportés au niveau international sont traités chimiquement pour lutter contre *Penicillium* spp. à l'aide de composés tels que l'imazalil et le thiabendazole (La Spada et al. 2021). L'utilisation de fongicides a des effets secondaires néfastes, notamment la présence de substances à toxicité aiguë dans les pelures de fruits et l'accumulation dans le sol, l'eau et les plantes de composés actifs non biodégradables, ce qui entraîne une contamination de l'environnement et des risques supplémentaires pour la santé humaine. Un autre aspect négatif de l'utilisation des pesticides synthétiques est l'émergence de souches résistantes dans les populations pathogènes. Conformément à la directive européenne 2009/128/CE, qui établit un cadre d'action communautaire pour l'utilisation durable des pesticides afin de réduire les risques pour la santé humaine tout en répondant à la demande croissante de produits de qualité, sûrs et respectueux de l'environnement, des solutions alternatives aux fongicides de synthèse ont été activement identifiées et testées. Ces alternatives comprennent l'utilisation de micro-organismes antagonistes ou de leurs dérivés biologiques (La Spada et al. l.c.; Riolo et al. 2023) ainsi que l'utilisation de substances naturelles (plantes et autres substances organiques) et d'autres composés antimicrobiens naturels (La Spada et al. l.c.; Yang et al. 2021).

3. References

1. Frisvad J., Samson R. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 49:1-174.
2. Baiyewu, R. A., Amusa, N. A., Ayoola O. A., Babalola O. (2007). Survey of the post-harvest diseases and aflatoxin contamination of marketed pawpaw fruit (*Carica papaya* L) in South Western Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*. 2, 178-18. DOI/10.5897/AJAR.9000665.
3. Bautista-Baños S (2014). Postharvest Decay: Control Strategies. Elsevier Inc. 1-383.
4. Costa J.H., Bazioli J.M., de Moraes Pontes J.G., Fill TP (2019). *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biol* 123(8):584-593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>
5. La Spada F., Aloï F., Coniglione M., Pane A., Cacciola S.O. (2021). Natural biostimulants elicit plant immune system in an integrated management strategy of the postharvest Green Mold of orange fruits incited by *Penicillium digitatum*. *Front Plant Sci* 12:1-16.

- Naqvi S (2006) Diagnosis and management of pre and post-harvest diseases of citrus fruit. *Dis Fruits Veg* 1:339-359.
6. Naqvi.S. (2006). Diagnosis and management of pre and post-harvest diseases of citrus fruit. *Dis. Fruits Veg.* 1:339-359.
7. Palou L. (2014) *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In *Postharvest Decay*, Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 45-102.
8. Riolo M., Luz C., Santilli E., Meca G., Cacciola S.O. (2023). Antifungal activity of selected lactic acid bacteria from olive drupes. *Food Bioscience* 52: Article 102422. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102422>
9. Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. and Perrone, G. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 78, 343-371. DOI: 10.1016/j. simyco. 2014. 09. 001
10. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (San Diego, California, USA: Academic Press, Inc), 315-322.

Pourriture des racines et du collet de l'amandier- *Phytophthora* spp.

La pourriture des racines et du collet de l'amandier est une maladie répandue associée à plusieurs espèces de *Phytophthora*, notamment *Phytophthora cambivora*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea* et *P. megasperma*, *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. niederhauserii*, *P. plurivora*, *P. chlamydospora*. À ce jour, la maladie a été signalée en Australie, en Espagne, en Californie, en Iran et en Turquie (Wicks et al., 1986; Wicks, 1989 ; Browne et al., 1997; Sahragard et al., 2006; Pérez-Sierra et al., 2010; Kurbetli et al., 2011; Abad et al., 2014; Browne et al., 2015; Çiftçi et al., 2016; Kurbetli et al., 2016; Türkölmez et al., 2016; Browne et al., 2020).



Fig. 1 Symptômes observés dans les échantillons de terrain et de pépinière d'amandiers : (a) jaunissement des feuilles ; (b) chancre et pourriture du collet ; (c) déclin général ; (d) exsudats de gomme à la base du tronc ; (e) pourriture des racines et du collet (image de Beluzán et al., 2022)

Comme pour les maladies similaires causées par des espèces de *Phytophthora*, le cycle de la pourriture des racines et du collet de l'amandier est complexe et implique de nombreuses sources d'inoculum primaire et secondaire et plusieurs modes de dissémination. L'inoculum primaire, qui survit sous forme de mycélium, d'oospores et de chlamydospores dans les tissus infectés, déclenche des épidémies lorsque les conditions environnementales sont favorables et que la présence d'une plante hôte stimule la germination des spores. Les conditions favorables au développement de la pourriture des racines et du collet de *Phytophthora* sont généralement des conditions tropicales humides. Ensuite, les zoospores, qui nagent à partir des sporanges, nagent vers la racine hôte en croissance et s'agrègent soit juste derrière l'extrémité de la racine, dans les blessures, ou dans les zones où les racines se ramifient. Ils s'encystent juste avant d'infecter la racine. Le cyste germe et commence à différencier les hyphes qui poussent à l'intérieur de l'hôte. Bien que la saturation du sol soit nécessaire pour l'infection, une fois que *Phytophthora* est à l'intérieur des tissus de la plante, il peut continuer à coloniser la racine même si le sol n'est pas saturé et se développe à travers le système racinaire. Au début, seules quelques racines fines sont endommagées. Ensuite, le pathogène se développe à travers le système racinaire dans les plus grosses racines jusqu'à ce qu'il atteigne la zone de la couronne racinaire où il tue le cambium. Par conséquent, les parties supérieures de la plante commencent à se flétrir et à mourir, et la pourriture des racines est accélérée. Les symptômes peuvent se développer rapidement lorsque la demande en eau de la plante augmente pendant les premières périodes sèches de l'été. Le succès de l'infection primaire conduit à la différenciation d'un inoculum secondaire à la surface des racines pourries. En général, *Phytophthora* dépend de l'eau libre pour se propager et infecter, et de l'activité humaine pour se propager sur de longues distances (Cacciola et al., 2011).

1. Diagnostic

1.1. Sur le terrain - symptômes

La pourriture des racines et du collet de l'amandier se produit généralement dans les arbres où un engorgement prolongé du sol s'est produit. Les symptômes sur les arbres infectés comprennent la chlorose et la chute prématurée des feuilles, l'amincissement progressif et le dépérissement de l'ensemble du couvert (Fig. 1). Les symptômes sur le couvert sont dus à la nécrose étendue des racines et à la réduction conséquente du système racinaire actif. D'autres symptômes comprennent le flétrissement, le chancre et l'écoulement abondant de gomme sur la tige.

1.2.1 En laboratoire - isolement à partir de matériel végétal infecté

Isolement à partir de tissus symptomatiques (racines ou fragments de collet). Les tissus symptomatiques sont soigneusement lavés à l'eau courante, désinfectés en surface dans du NaClO à 1 % pendant 2 min, puis plongés dans de l'EtOH à 70 % pendant 30 s, rincés à l'eau distillée stérile, séchés et placés sur du PARPNH V8-agar sélectif (Jung et al., 1996). Après une période d'incubation de 24 à 48 heures dans l'obscurité à 25°C, des cultures pures sont obtenues en transférant des hyphes individuels qui se développent sur un agar à base de jus de V8 (V8A) (Erwin et Ribeiro, 1996). Les cultures pures sont finalement obtenues par culture d'hyphes individuels sur de l'agar à base de V8.

1.2.2 En laboratoire - identification moléculaire des isolats

Bien que l'identification des isolats de *Phytophthora* repose largement sur des clés de détermination synthétiques (Waterhouse, 1963; Newhook et al., 1978; Stamps et al., 1990) basées sur des critères morphologiques, le faible nombre de microstructures différentes ainsi que la grande variabilité intra-spécifique et les caractères chevauchants entre les espèces rendent ces approches inadéquates (Cacciola et al., 2011).

Pour cette raison, les méthodes moléculaires basées sur la PCR représentent aujourd'hui la meilleure approche pour identifier les isolats de *Phytophthora*. La condition préalable à l'application de la PCR est l'extraction d'ADN à partir d'une culture pure. À cette fin, des kits commerciaux peuvent être utilisés.

Le protocole de PCR conventionnel le plus courant pour l'identification des isolats de *Phytophthora* consiste en l'amplification, le séquençage et l'analyse bioinformatique des codes-barres Internal Transcribed Spacer (ITS) de l'ADN ribosomique (rDNA) et de la cytochrome oxydase (cox) 1 de l'ADN mitochondrial (mtDNA) (Robideau et al., 2011). La région ITS peut être amplifiée en utilisant les paires d'amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) ou ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') (Cooke et al., 2000) / ITS4. Le code-barres

COX 1 peut être amplifié en utilisant des amorces spécifiques aux oomycètes, OomCox1-Levup (5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3') et Fm85mod (5'-RRHWACKTGACTDATRATACCAA-3') (Robideau et al., 2011).

1.2.3. En laboratoire - détection du matériel végétal infecté par *Phytophthora* par PCR en temps réel

En raison de la grande variabilité des différentes espèces de *Phytophthora* impliquées dans la pourriture des racines et du collet, aucun protocole de PCR en temps réel spécifique aux espèces n'est suggéré. Une stratégie plus efficace consiste à détecter et quantifier l'ADN de *Phytophthora* présent dans les tissus végétaux. À cette fin, trois tests TaqMan RT-PCR sont proposés : i. région Internal Transcribed Spacer (ITS) (amplifiée à l'aide des amorces All_Phy_probe et FITS_15Ph, RITS_279Ph) ; ii. région trnM-trnP-trnM (amplifiée à l'aide de la sonde TrnM_PhyG_probe2 et des amorces PhyG-F2, PhyG-Rb) ; iii. région atp9-nad9 (amplifiée à l'aide de la sonde ATP9_PhyG2_probeR et des amorces PhyG_ATP9_2FTail, PhyG_R6_Tail). Les détails sur les amorces et les sondes sont reportés dans Puertolas et al. (2021).

2. Gestion

De nombreuses études démontrent le rôle crucial de l'état hydrique du sol sur la production de sporanges et l'apparition d'infections racinaires par les espèces de *Phytophthora*. Comme l'asphyxie due à la saturation en eau du sol prédispose les racines à l'infection de ces pathogènes, les pourritures des racines et du collet de *Phytophthora* sont associées à la fois aux sols lourds et aux périodes prolongées de pluie (Cacciola et al., 2007). Par conséquent, la gestion de l'eau du sol est essentielle pour le contrôle de cette maladie (Cacciola et al., 2011).

Une sélection et une préparation minutieuses du site de plantation pourraient aider à prévenir les problèmes de saturation en eau du sol. De même, les pratiques culturales qui évitent une saturation prolongée du sol, comme la plantation sur des buttes, le drainage du sol et une gestion adéquate de l'irrigation, peuvent réduire la pourriture des racines et du collet (Cacciola et al., 2011). Les technologies d'irrigation impliquant l'utilisation d'émetteurs qui n'humidifient pas les troncs et les instruments qui mesurent l'état hydrique du sol, tels que les tensiomètres et les sondes neutroniques, peuvent être précieuses pour le développement d'une approche intégrée de la gestion de la maladie (Cacciola et al., 2011).

3. Références

1. Abad, G.; Abad, J.; Cacciola, S.; Pane, A.; Faedda, R.; Moralejo, E.; Pérez-Sierra, A.; Abad-Campos, P.; Álvarez-Bernaola, L.; Bakonyi, J.; et al. *Phytophthora niederhauserii* sp. nov., a polyphagous species associated with ornamentals, fruit trees and native plants in 13 countries. *Mycologia* **2014**, *106*, 431-447
2. Beluzán, F.; Miarnau, X.; Torguet, L.; Armengol, J.; Abad-Campos, P. Survey of Oomycetes Associated with Root and Crown Rot of Almond in Spain and Pathogenicity of *Phytophthora niederhauserii* and *Phytophthora vexans* to 'Garnem' Rootstock. *Agriculture* **2022**, *12*, 294. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020294>
3. Browne, G.; Schmidt, L.; Brar, G. First report of *Phytophthora niederhauserii* causing crown rot of almond (*Prunus dulcis*) in California. *Plant. Dis.* **2015**, *99*, 1863
4. Browne, G.; Viveros, M. Diverse symptoms and tree losses caused by *Phytophthora* spp. in California almonds. *Acta Hort.* **1997**, *470*, 570-575.
5. Browne, G.; Ott, N.; Forbes, H.; Yaghmour, M.; Milliron, L. First Report of *Phytophthora chlamydospora* causing crown and root rot on almond in California. *Plant. Dis.* **2020**, *104*, 2033.
6. Cacciola, S.O.; Faedda, R.; Pane, A.; Scarito, G. Root and crown rot of olive caused by *Phytophthora* spp. In *Olive Diseases and Disorders*; Schena, L., Agosteo, G.E., Cacciola, S.O., Eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, Kerala, India, **2011**; pp. 305-327.
7. Çiftçi, O.; Türkölmez, Ş.; Derviş, S.; Serçe, Ç. First report of canker and root rot of almond caused by *Phytophthora plurivora* in Turkey. *Plant. Dis.* **2016**, *100*, 1507.
8. Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, *30*, 17-32
9. Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. *Phytophthora Diseases Worldwide*; APS Press—The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, **1996**; pp. 84-95, 96-144, 456-463.
10. Jung, T.; Blaschke, H.; Neumann, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Pathol.* **1996**, *26*, 253-272.
11. Kurbetli, I.; Değirmenci, K. First report of *Phytophthora taxon niederhauserii* causing decline of almond in Turkey. *New Dis. Rep.* **2011**, *23*, 14.
12. Kurbetli, İ.; Yılmaz, A. Almond decline caused by *Phytophthora megasperma* in southeastern Anatolian region of Turkey. *J. Turk. Phytopathol.* **2016**, *45*, 13-20.
13. Newhook F.J., Waterhouse G.M., and Stamps, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey (UK) Mycological Papers* **1978**, *143*, 20.
14. Pérez-Sierra, A.; León, M.; Álvarez, L.; Alaniz, S.; Berbegal, M.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, P. Outbreak of a new *Phytophthora* sp. associated with severe decline of almond trees in eastern Spain. *Plant. Dis.* **2010**, *94*, 534-541.
15. Puertolas A., Bonants P.J.M., Boa E., Woodward S. Application of Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Oomycetes in Ornamental Nursery Stock. *Journal of Fungi*. **2021**; *7*(2):87. <https://doi.org/10.3390/jof702008>
16. Robideau G.P., De Cock A.W.A.M., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K., et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour.* **2011**; *11*: 1002-1011. pmid:21689384

17. Sahragard, N.; Banihashemi, Z. Evaluation of resistance of some almond genotypes and cultivars to *Phytophthora cactorum*. Iran. J. Plant. Pathol. **2006**, 42, 97–99.
18. Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J., and Hall, G.S. Revised Tabular Key to the species of *Phytophthora*, Mycological Papers. **1990**; 162, 1.
19. Türkölmez, Ş.; Derviş, S.; Çiftçi, O.; Ulubaş Serçe, Ç. First report of *Phytophthora chlamydospora* causing root and crown rot on almond (*Prunus dulcis*) trees in Turkey. Plant. Dis. **2016**, 100, 1796.
20. Waterhouse, G.M. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK), Mycological Papers. **1963**; 92, 22.
21. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315–322.
22. Wicks, T.; Lee, T. *Phytophthora* crown rot of almond trees. Aust. J. Agric. Res. **1986**, 37, 277–287
23. Wicks, T. Susceptibility of almond and cherry rootstocks and scions to *Phytophthora* species. Aust. J. Exp. Agric. **1989**, 29, 103–109.

Pourriture racinaire et du collet de l'olivier- *Phytophthora* spp.

En raison de l'expansion des plantations dans de nouvelles zones avec des sols lourds et de l'utilisation plus intensive de l'irrigation dans les pépinières et les vergers d'oliviers commerciaux, au cours des dernières années, la nourriture racinaire et du collet de *Phytophthora* (Fig. 1) émerge comme une maladie grave dans plusieurs pays producteurs d'olives tels que l'Australie, l'Italie et l'Espagne (Cacciola et al., 2011).

La maladie a été signalée dans la plupart des pays producteurs d'olives et est causée par plusieurs espèces de *Phytophthora* présentes dans le sol, appartenant au genre *Phytophthora*, notamment *Phytophthora acerina*, *P. bilobang*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. gonapodyides*, *P. inundata*, *P. megasperma*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. pini* et *P. plurivora* (Cacciola et al., 2011; Santilli et al. 2020).



Fig. 1 Symptômes de déclin sur un arbre d'olivier (*Olea europaea*) cv. Nera di Gonnos incités par *Phytophthora bilobang* en Calabre.

Le cycle de la maladie est complexe car il implique de nombreuses sources d'inoculum primaire

et secondaire et plusieurs modes de dissémination ; toutes ces caractéristiques confèrent à cet organisme une grande plasticité. L'inoculum primaire, qui survit sous forme de mycélium, d'oospores et de chlamydospores dans les tissus infectés, déclenche des épidémies lorsque les conditions environnementales sont favorables et que la présence d'une plante hôte stimule la germination des spores ; les conditions propices au développement de la pourriture racinaire et du collet de *Phytophthora* sont généralement des conditions tropicales humides. Ensuite, les zoospores, qui émergent des sporanges, nagent vers la racine hôte en croissance et s'agrègent soit juste derrière l'extrémité de la racine, dans les plaies, soit dans les zones où les racines se ramifient. Ils s'encystent juste avant d'infecter la racine. Le cyste germe et commence à différencier les hyphes qui poussent à l'intérieur de l'hôte. Bien que la saturation du sol soit nécessaire pour l'infection, une fois que *Phytophthora* est à l'intérieur des tissus de la plante, il peut continuer à coloniser la racine même si le sol n'est pas saturé et se propage à travers le système racinaire. Au début, seules quelques racines fines sont endommagées. Ensuite, le pathogène se propage dans le système racinaire jusqu'aux racines plus grosses, jusqu'à atteindre la zone de la couronne racinaire où il tue le cambium. Par conséquent, les parties supérieures de la plante commencent à se flétrir et à mourir, et la pourriture des racines s'accélère. Les symptômes peuvent se développer rapidement lorsque la demande en eau de la plante augmente pendant les premières périodes sèches de l'été. Le succès de l'infection primaire conduit à la différenciation de l'inoculum secondaire à la surface des racines pourries. En général, *Phytophthora* dépend de l'eau libre pour se propager et s'infecter, et de l'activité humaine pour se propager sur de longues distances. Les épidémies explosives sont causées par l'augmentation rapide de l'inoculum secondaire et la pente de la courbe de progression de la maladie dépend du taux de réussite de propagation de ces propagules. Dans les régions méditerranéennes, les températures pendant l'hiver peuvent limiter le développement des infections racinaires des espèces ayant une température optimale plus élevée, telles que *P. nicotianae* et *P. palmivora* (Cacciola et al., 2011).

Diagnostic

1.1. Sur le terrain - symptômes

La pourriture du collet et des racines de l'olivier causée par *Phytophthora* se produit généralement dans les jeunes arbres où un engorgement prolongé du sol en eau a eu lieu ; seulement occasionnellement, cependant, cette maladie a été trouvée également sur des arbres croissant dans des sols bien drainés. Les symptômes sur les arbres infectés comprennent la chlorose et la chute prématurée des feuilles, l'amincissement progressif et le dépérissement de l'ensemble de la canopée (Fig. 1). Les symptômes sur la canopée sont causés par la nécrose étendue des racines et par la réduction conséquente du système racinaire actif. Lorsque les conditions du sol sont propices à l'infection, une pourriture de la couronne et de la tige basale entourant l'arbre, qui peut être mieux remarquée en déterrants l'arbre, peut se produire. Les arbres infectés déclinent progressivement sur plusieurs années ou meurent soudainement. Les arbres chroniquement infectés semblent rabougris (Cacciola et al., 2011; Santilli et al., 2020).

1.2.1 En laboratoire - isolement à partir de matériel végétal infecté

Isolement à partir de tissus symptomatiques (racines ou fragments de collet). Les tissus symptomatiques sont soigneusement lavés à l'eau du robinet, désinfectés superficiellement dans du NaClO à 1 % pendant 2 min, puis immergés dans de l'EtOH à 70 % pendant 30 s, rincés à l'eau distillée stérile, séchés et placés sur un agar sélectif PARPNH V8 (Jung et al., 1996). Après une période d'incubation de 24 à 48 h dans l'obscurité à 25°C, les cultures pures sont obtenues en transférant des hyphes uniques en croissance sur un agar de jus V8 (V8A) (Erwin et Ribeiro, 1996). Les cultures purifiées sont finalement obtenues par culture d'hyphes uniques sur un agar V8.

1.2.2 En laboratoire - identification moléculaire des isolats

Bien que l'identification des isolats de *Phytophthora* se soit largement appuyée sur des clés synoptiques (Waterhouse, 1963; Newhook et al., 1978; Stamps et al., 1990) basées sur des critères morphologiques, le faible nombre de microstructures différentes ainsi que la grande variabilité intra-spécifique et les caractères chevauchants entre les espèces rendent ces approches inadéquates (Cacciola et al., 2011). Pour cette raison, les méthodes moléculaires basées sur la PCR représentent aujourd'hui la meilleure approche pour identifier les isolats de *Phytophthora*.

Le prérequis à l'application de la PCR est l'extraction de l'ADN à partir de cultures pures. À cette fin,

des kits commerciaux peuvent être utilisés.

Le protocole PCR conventionnel le plus courant pour l'identification des isolats de *Phytophthora* consiste en l'amplification, le séquençage et l'analyse bioinformatique des codes-barres Internal Transcribed Spacer (ITS) de l'ADNr et du cytochrome oxydase (cox) 1 de l'ADN mitochondrial (mtDNA) (Robideau et al., 2011). La région ITS peut être amplifiée en utilisant les paires d'amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) ou ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') (Cooke et al., 2000) / ITS4. Le code-barres COX 1 peut être amplifié en utilisant les amorces spécifiques des oomycètes OomCox1-Levup (5'-TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC-3') et Fm85mod (5'-RRHWACKTGACTDATRATACCAA-3') (Robideau et al., 2011).

1.2.3. En laboratoire - détection du matériel végétal infecté par *Phytophthora* par PCR en temps réel

En raison de la grande variabilité des différentes espèces de *Phytophthora* impliquées dans la pourriture des racines et du collet de l'olivier, aucun protocole de PCR en temps réel spécifique à une espèce n'est suggéré. Une stratégie plus efficace peut consister à détecter et quantifier l'ADN de *Phytophthora* présent dans le tissu végétal. À cette fin, trois tests de TaqMan RT-PCR sont proposés: i. région Internal Transcribed Spacer (ITS) (amplifiée en utilisant les sondes All_Phy_probe et FITS_15Ph, les amorces RITS_279Ph) ; ii. région trnM-trnP-trnM (amplifiée en utilisant les sondes TrnM_PhyG_probe2 et les amorces PhyG-F2, PhyG-Rb) ; iii. région atp9-nad9 (amplifiée en utilisant la sonde ATP9_PhyG2_probeR et les amorces PhyG_ATP9_2FTail, PhyG_R6_Tail). Les détails sur les amorces et les sondes sont rapportés dans Puertolas et al. (2021).

2. Gestion

De nombreuses études démontrent le rôle crucial du statut hydrique du sol à la fois dans la production de sporanges et l'apparition d'infections racinaires par les espèces de *Phytophthora*. Comme l'asphyxie due à la saturation en eau du sol prédispose les racines à l'infection de ces agents pathogènes, la pourriture du collet et des racines de l'olivier est associée à la fois aux sols lourds et aux périodes prolongées de pluie (Teviotdale, 2005 ; Cacciola et al., 2007). Par conséquent, la gestion de l'eau du sol est fondamentale pour le contrôle de cette maladie (Cacciola et al., 2011).

La sélection soigneuse et la préparation du site de plantation pourraient aider à prévenir les problèmes de saturation en eau du sol. De même, les pratiques culturales qui empêchent une saturation prolongée du sol, telles que la plantation sur des monticules, le drainage du sol et la gestion appropriée de l'irrigation, peuvent réduire la pourriture du collet et des racines (Cacciola et al., 2011).

Les technologies d'irrigation impliquant l'utilisation d'émitteurs qui n'humidifient pas les troncs et les instruments qui mesurent l'état hydrique du sol, tels que les tensiomètres et les sondes neutroniques, peuvent être précieux pour le développement d'une approche de gestion intégrée de la maladie (Cacciola et al., 2011).

Références

- Cacciola, S.O., Scarito, G., Salamone, A., Fodale, A.S., Mulè, R., Piraino, G., and Sammarco, G. **2007**. Integrated Protection of Olive Crops. A. Kalaitzaki (Eds.), IOBC/wprs Bull., 30, 251.
- Cacciola, S.O.; Faedda, R.; Pane, A.; Scarito, G. Root and crown rot of olive caused by *Phytophthora* spp. In Olive Diseases and Disorders; Schena, L., Agosteo, G.E., Cacciola, S.O., Eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, Kerala, India, **2011**; pp. 305–327.
- Cooke, D.E.L.; Drenth, A.; Duncan, J.M.; Wagels, G.; Brasier, C.M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, 30, 17–32
- Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. *Phytophthora Diseases Worldwide*; APS Press—The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, **1996**; pp. 84–95, 96–144, 456–463.
- Jung, T.; Blaschke, H.; Neumann, P. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur. J. For. Pathol.* **1996**; 26, 253–272.
- Newhook F.J., Waterhouse G.M., and Stamps, D.J. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey (UK) Mycological Papers* **1978**, 143, 20.
- Puertolas A., Bonants P.J.M., Boa E., Woodward S. Application of Real-Time PCR for the Detection and Quantification of Oomycetes in Ornamental Nursery Stock. *Journal of Fungi*. **2021**; 7(2):87. <https://doi.org/10.3390/jof702008>
- Robideau G.P., De Cock A.W.A.M., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K., et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour.* **2011**; 11: 1002–1011. pmid:21689384
- Santilli, E.; Riolo, M.; La Spada, F.; Pane, A.; Cacciola, S.O. First Report of Root Rot Caused by *Phytophthora bilorbang* on *Olea europaea* in Italy. *Plants* **2020**, 9, 826. <https://doi.org/10.3390/plants9070826>
- Stamps, D.J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J., and Hall, G.S. Revised Tabular Key to the species of *Phytophthora*, *Mycological Papers*. **1990**; 162, 1.
- Teviotdale, B.E. **2005**, Diseases of olive. Olive production manual 2nd edition, G.S. Sibbett, L. Ferguson, J.L. Coviello, and M. Lindstrand (Eds.), University of California, Division of Agriculture and Natural

Resources, Oakland, Publ. N. 3353, 119

12. Waterhouse, G.M. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK), Mycological Papers. **1963**; 92, 22.
13. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego, CA: Academic Press Inc), 315-322.

Protocole d'analyse des tissus végétaux par spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol

Introduction

La spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol est une technique analytique utilisée pour analyser la composition de la surface des matériaux solides au niveau moléculaire. La ToF-SIMS fournit des informations détaillées sur la composition élémentaire et moléculaire et la distribution spatiale des espèces présentes à la surface d'un échantillon¹. En ToF-SIMS, un faisceau d'ions primaires de haute énergie, généralement composé de césium ou de bismuth, est dirigé vers la surface de l'échantillon. Lors de l'impact, les ions primaires délogent et ionisent les ions secondaires de la surface de l'échantillon. Ces ions secondaires sont ensuite extraits, accélérés et détectés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) à l'aide d'un spectromètre de masse à temps de vol. L'instrument ToF-SIMS mesure le temps de vol des ions secondaires depuis la surface de l'échantillon jusqu'au détecteur. Le temps de vol est directement proportionnel au rapport masse/charge des ions, ce qui permet de les identifier et de les quantifier. En balayant le faisceau d'ions primaires à travers la surface de l'échantillon, ToF-SIMS peut générer des images bidimensionnelles qui décrivent la distribution spatiale d'espèces moléculaires ou élémentaires spécifiques. La ToF-SIMS peut fournir des informations précieuses sur la composition chimique des surfaces, telles que les composés organiques et inorganiques, les polymères, les métaux, les semi-conducteurs et les matériaux biologiques. Elle est largement utilisée dans divers domaines, notamment la science des matériaux, la chimie des surfaces, l'analyse des couches minces, la recherche sur les semi-conducteurs, la recherche biomédicale et la médecine légale.

ToF-SIMS est un outil précieux pour l'analyse de surface dans le domaine de la science des plantes et peut contribuer à une meilleure compréhension des propriétés chimiques et structurales des échantillons végétaux². Il peut être utilisé pour étudier des échantillons végétaux tels que des feuilles ou du bois, ce qui permet d'obtenir des informations précieuses sur la composition de la surface et les caractéristiques chimiques de l'échantillon végétal. Lors de l'analyse d'échantillons végétaux, la ToF-SIMS peut fournir des informations sur la distribution de divers éléments, composés organiques et biomolécules présents à la surface. Il peut détecter et identifier un large éventail d'espèces chimiques, notamment des lipides, des sucres, des protéines, des pigments, de la lignine, de la cellulose et d'autres composants importants pour comprendre la composition et la structure des feuilles, du bois et d'autres matériaux végétaux. En analysant la composition moléculaire et la distribution spatiale de ces composés, ToF-SIMS peut fournir des informations sur la physiologie, le métabolisme et les interactions environnementales des plantes. Il peut être utilisé pour étudier les effets des facteurs environnementaux, tels que les polluants ou les agents pathogènes, sur la chimie de surface des feuilles. Elle peut également être utile dans la caractérisation des échantillons de bois, y compris l'identification des différentes espèces de bois, l'évaluation de la dégradation du bois et l'évaluation des méthodes de traitement³.

Préparation de l'échantillon

L'analyse ToF-SIMS nécessite que l'échantillon soit placé sous vide. La raison principale en est que l'échantillon est bombardé par un faisceau d'ions primaires et que les ions secondaires qui en résultent sont détectés et analysés. L'utilisation de l'instrument sous vide garantit que les

1 Benninghoven, A. (1994). Chemical analysis of inorganic and organic surfaces and thin films by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(10), 1023-1043.

2 Perkins, M. C., Bell, G., Briggs, D., Davies, M. C., Friedman, A., Hart, C. A., ... & Rutten, F. J. M. (2008). The application of ToF-SIMS to the analysis of herbicide formulation penetration into and through leaf cuticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(1), 1-13.

3 La Spada, F., Pane, A., Licciardello, A., Debdoubi, A., Tuccitto, N., & Cacciola, S. O. (2022). A super absorbent polymer containing copper to control *Plenodomus tracheiphilus* the causative agent of mal secco disease of lemon. *Frontiers in Microbiology*, 13, 987056.

ions secondaires peuvent se déplacer librement jusqu'au détecteur sans diffusion importante ni interférence de la part des molécules de gaz. Les conditions de vide peuvent potentiellement causer certains problèmes ou artefacts lors de l'analyse d'échantillons végétaux avec la ToF-SIMS, tels que :

- **Déshydratation de l'échantillon:** Les conditions de vide peuvent provoquer l'évaporation de composés volatils, ce qui entraîne la déshydratation de l'échantillon. Les échantillons végétaux, tels que les feuilles ou le bois, contiennent souvent de l'humidité et des composants volatils qui peuvent être perdus au cours du processus de mise sous vide. La déshydratation peut affecter la composition de la surface de l'échantillon et modifier la distribution de certains composés.
- **Modifications structurelles:** Les échantillons végétaux peuvent subir des modifications structurelles sous vide en raison de l'élimination de l'humidité ou des changements de pression. Ces modifications structurelles peuvent avoir un impact sur la chimie de surface et la composition globale de l'échantillon, ce qui peut affecter les résultats de l'analyse ToF-SIMS.

Pour atténuer ces problèmes, certaines précautions peuvent être prises lors de l'analyse d'échantillons végétaux par ToF-SIMS sous vide:

- Minimiser la durée d'exposition au vide pour réduire les effets de la déshydratation.
- Envisager des techniques cryogéniques ou d'autres méthodes de préparation des échantillons pour préserver l'état natif de l'échantillon.
- Utiliser des techniques appropriées de manipulation des échantillons et assurer un environnement propre sous vide pour minimiser les risques de contamination.

Il est important d'évaluer les exigences spécifiques de l'étude et de consulter des opérateurs expérimentés afin de déterminer l'approche la plus appropriée pour analyser les échantillons végétaux tout en minimisant les effets négatifs potentiels des conditions de vide.

Les techniques cryogéniques de préparation des échantillons consistent à soumettre l'échantillon à de basses températures à l'aide de cryogènes, tels que l'azote liquide. Ces techniques sont utilisées pour préserver l'état natif des échantillons et minimiser tout changement ou artefact potentiel au cours de l'analyse⁴. Voici quelques techniques cryogéniques utilisées dans la préparation des échantillons:

Cryo-fixation: La cryo-fixation consiste à congeler rapidement l'échantillon végétal à l'aide d'azote liquide ou d'autres cryogènes. Cette technique permet d'immobiliser la structure de l'échantillon et de préserver ses propriétés à un moment précis. La cryo-fixation est souvent utilisée en microscopie électronique pour capturer des échantillons dans leur état natif, ce qui permet d'obtenir une imagerie à haute résolution sans altération structurelle significative.

Cryo-sectionnement: La cryo-section est une technique utilisée pour obtenir de fines tranches (sections) d'un échantillon congelé. L'échantillon végétal est inclus dans un milieu, tel qu'une résine ou de la gélatine, et rapidement congelé à l'aide d'azote liquide. Le bloc congelé est ensuite sectionné à l'aide d'un cryostat, qui permet une coupe précise de l'échantillon à basse température. La cryo-section est couramment utilisée dans diverses applications, notamment l'histologie et la préparation d'échantillons biologiques pour l'imagerie ou l'analyse.

Cryo-microtomie: La cryo-microtomie est similaire à la cryo-section, mais elle est spécifiquement utilisée pour couper de fines sections d'échantillons en vue d'une analyse au microscope. L'échantillon est congelé et un microtome équipé d'une chambre cryogénique est utilisé pour couper de fines tranches de l'échantillon tout en maintenant de basses températures. La cryo-microtomie est fréquemment utilisée en science des matériaux, en biologie et dans d'autres domaines où la préservation de la structure de l'échantillon est cruciale.

Cryo-empoilage: Le cryo-empoilage consiste à inclure l'échantillon dans un milieu cryo-protecteur,

⁴ Passarelli, M. K., & Winograd, N. (2011). Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 976-990.

tel qu'un composé ou une résine OCT (Optimal Cutting Temperature), et à le congeler en vue d'une analyse ultérieure. L'échantillon cryo-enrobé peut être sectionné, monté et soumis à diverses techniques d'analyse tout en conservant l'intégrité de la structure de l'échantillon.

En utilisant des techniques cryogéniques, les échantillons peuvent être préservés dans leur état d'origine, en minimisant la déshydratation, les changements structurels et d'autres artefacts qui peuvent survenir au cours des méthodes traditionnelles de préparation des échantillons. La préparation cryogénique des échantillons est particulièrement utile pour les études portant sur des échantillons délicats ou sensibles à la température, tels que les tissus biologiques, les polymères et les matériaux mous.

Conditions d'analyse

Les dommages causés par les faisceaux d'ions peuvent survenir lors de l'analyse d'échantillons végétaux à l'aide de techniques telles que le ToF-SIMS. Les ions primaires à haute énergie du ToF-SIMS peuvent provoquer une pulvérisation, c'est-à-dire l'élimination physique d'atomes ou de molécules de la surface de l'échantillon. La pulvérisation peut entraîner la perte de couches superficielles, notamment de composés organiques et de biomolécules. Cela peut affecter la représentation de la composition réelle de la surface de l'échantillon et modifier la distribution spatiale de certains composants. Le dépôt d'énergie du faisceau d'ions peut induire des modifications structurelles dans les échantillons végétaux. Les ions peuvent rompre des liaisons chimiques, perturber l'arrangement moléculaire et provoquer des changements dans la morphologie de la surface de l'échantillon. Ces modifications structurelles peuvent avoir un impact sur la chimie de surface et altérer la distribution des espèces chimiques. Le faisceau d'ions peut également induire des transformations chimiques dans l'échantillon végétal. Les ions à haute énergie peuvent rompre ou réarranger des liaisons chimiques, entraînant la formation de nouvelles espèces chimiques ou la modification d'espèces existantes. Il peut en résulter des artefacts chimiques ou la production de composés secondaires qui n'étaient pas présents à l'origine sur la surface de l'échantillon.

Pour atténuer ces effets, il est important d'examiner attentivement les conditions du faisceau d'ions utilisé dans l'analyse. L'optimisation de l'énergie, de la dose et de la taille du faisceau d'ions peut contribuer à minimiser l'étendue des dommages causés aux échantillons végétaux. Il est également important de sélectionner les paramètres d'analyse appropriés pour s'assurer que les données obtenues représentent avec précision la composition de la surface de l'échantillon. En outre, des techniques complémentaires peuvent être utilisées pour corroborer et compléter les résultats obtenus par l'analyse par faisceau d'ions. Des techniques telles que la microscopie, la spectroscopie ou les techniques d'imagerie qui ne font pas appel à des faisceaux d'ions à haute énergie peuvent fournir des informations supplémentaires sur la structure et la composition des échantillons végétaux, contribuant ainsi à valider les résultats obtenus par l'analyse par faisceaux d'ions.

Il est essentiel de comprendre les effets potentiels des dommages causés par les faisceaux d'ions et de contrôler soigneusement les conditions expérimentales pour interpréter correctement les résultats et obtenir des informations significatives sur la composition de la surface des échantillons végétaux. Les faisceaux d'ions en grappe peuvent offrir certains avantages lors de l'analyse d'échantillons végétaux ou d'autres matériaux sensibles⁵. Ils sont constitués de grappes d'atomes ou de molécules au lieu d'ions individuels et peuvent présenter des avantages par rapport aux faisceaux d'ions monoatomiques, tels que la réduction des effets de pulvérisation et des dommages. Les faisceaux d'ions en grappe peuvent améliorer la détection et la caractérisation des espèces moléculaires sur les échantillons végétaux. La taille plus importante des grappes et l'impact collectif de plusieurs atomes ou molécules dans une grappe peuvent favoriser la désorption de fragments moléculaires intacts, ce qui permet d'obtenir des informations moléculaires plus complètes sur l'échantillon. Leur taille plus importante et l'énergie plus faible par atome constitutif se traduisent par une énergie de dépôt spécifique qui peut induire moins de dommages structurels sur les échantillons végétaux. Cela permet de préserver l'intégrité de la structure de l'échantillon, de minimiser les transformations chimiques et de fournir une représentation plus précise de la composition de la surface. Les faisceaux d'ions en grappe peuvent améliorer la sensibilité de détection de certaines

5 Winograd, N. (2005). The magic of cluster SIMS.

espèces sur les échantillons végétaux. L'efficacité accrue de la désorption et de l'ionisation des faisceaux peut conduire à une augmentation de l'intensité des signaux, ce qui permet de détecter des composants peu abondants ou à l'état de traces qui peuvent présenter un intérêt pour l'analyse. Cependant, il est important de noter que le choix du faisceau d'ions, qu'il soit monoatomique ou en grappe, dépend des exigences spécifiques de l'analyse et de la nature de l'échantillon végétal étudié. Les conditions optimales du faisceau d'ions doivent être soigneusement sélectionnées pour équilibrer le besoin d'une intensité de signal suffisante, d'un endommagement minimal et d'une représentation précise de la composition de la surface de l'échantillon.

Traitement des données

L'analyse ToF-SIMS d'échantillons végétaux acquis à l'aide de faisceaux de grappes produit probablement des ensembles de données très riches et complexes. L'analyse multivariée peut être très utile pour traiter et interpréter les ensembles de données complexes obtenus à partir de l'analyse ToF-SIMS.⁶ L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique d'analyse multivariée largement utilisée qui peut être appliquée aux données ToF-SIMS afin de réduire la dimensionnalité, d'identifier des modèles et d'extraire des informations significatives.

Les données ToF-SIMS comprennent souvent un grand nombre de variables (valeurs d'intensité pour chaque rapport m/z). L'ACP peut condenser cet ensemble de données à haute dimension en un plus petit nombre de composantes principales (CP) tout en conservant la plupart des variations pertinentes dans les données. Cette réduction de la dimensionnalité simplifie l'interprétation et la visualisation des données. L'ACP permet d'explorer les modèles et les similitudes inhérents à l'ensemble de données ToF-SIMS. En représentant les échantillons ou les variables dans l'espace des composantes principales, on peut identifier des groupes, des tendances ou des valeurs aberrantes qui peuvent correspondre à des groupes d'échantillons distincts, à des caractéristiques chimiques ou à des compositions de surface. Cela permet de comprendre la structure sous-jacente des données. L'ACP permet d'identifier les variables les plus influentes (rapports m/z) contribuant à la variation observée dans l'ensemble de données. Les valeurs de charge associées à chaque composante principale indiquent le poids des différentes variables. Les variables à forte charge peuvent indiquer des rapports m/z significatifs pour la différenciation des échantillons ou la saisie de différences chimiques clés. L'ACP peut être utilisée pour la classification ou la discrimination des échantillons végétaux sur la base de leurs données ToF-SIMS. En assignant les échantillons à des groupes ou catégories spécifiques à l'aide d'échantillons de référence connus, l'ACP peut faciliter l'identification des similitudes ou des différences entre les groupes d'échantillons, ce qui facilite la classification et la caractérisation. Avant l'ACP, des étapes appropriées de prétraitement des données, telles que la normalisation ou la mise à l'échelle, peuvent être nécessaires pour supprimer les variations systématiques ou les artefacts dans l'ensemble de données. Cela permet de s'assurer que les résultats de l'ACP ne sont pas faussés par des facteurs sans rapport avec la composition de l'échantillon sous-jacent. Il convient de noter que l'ACP n'est qu'une des nombreuses techniques d'analyse multivariée disponibles pour les données ToF-SIMS provenant d'un ensemble de données végétales. D'autres méthodes, telles que la régression par moindres carrés partiels (PLS) ou les algorithmes de regroupement, peuvent également être employées en fonction des objectifs et des caractéristiques spécifiques de l'ensemble de données. Les techniques d'analyse multivariée telles que l'ACP peuvent efficacement extraire des informations significatives, révéler des modèles cachés et faciliter l'interprétation d'ensembles de données ToF-SIMS complexes, permettant une compréhension plus approfondie de la composition et de la chimie de la surface des échantillons analysés.

Protocole d'extraction de substances naturelles à activité biologique provenant des sous-produits de l'agriculture

Introduction

Les composés phénoliques ont été répertoriés (identifiés) dans de nombreuses noix. Ces composés présentent de nombreuses propriétés. De nombreux travaux ont montré leur impact bénéfique sur la santé humaine, avec des propriétés cardioprotectives, neuroprotectives, antidiabétiques, anti-inflammatoires et antioxydantes.

La valorisation des déchets et des sous-produits d'amandes riches en polyphénols s'avère une alternative prometteuse pour combler les besoins en ces principes actifs.

Objectif

Procédure d'extraction de substances naturelles biologiquement actives dans la lutte contre les maladies des plantes et/ou utiles à des fins thérapeutiques dans les maladies humaines et animales.

Méthodologie

1- Méthodologie d'isolement des téguments (de l'enveloppe)

Les amandes entières sont décortiquées puis la coque est éliminée. Les graines d'amandes sont soumises au protocole expérimental suivant : Méthode de congélation-décongélation afin d'isoler la peau d'amande naturelle (Mandalari et *al.*, 2010a). Cette étape consiste à congeler les graines à -20°C et à les décongeler en les plaçant à 4°C successivement (Mandalari et *al.*, 2010a).

Les peaux sont ensuite retirées et laissées sécher à l'air libre puis conservées à l'obscurité. La matière sèche, obtenue par déshydratation de la matière végétale isolée de chaque groupe mentionné précédemment est ensuite finement broyée au mortier.

2- Extraction des lipides totaux : Méthode de Soxhlet

Une étape préliminaire d'extraction par la méthode à reflux de soxhlet est entamée afin d'éliminer les lipides et les pigments (Milbury et *al.*, 2006) et de déshuiler au maximum l'extrait sec.

Afin d'exprimer les rendements en huile, la matière grasse a été extraite par la méthode à reflux de soxhlet qui permet de déshuiler au maximum l'extrait sec : 6 grammes des peaux d'amandes broyées sont disposés dans une cartouche, et sont introduits dans un extracteur de type soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 250 mL dans lequel 220 mL du solvant éther de pétrole sont introduits. Le solvant est amené à l'ébullition à environ 55°C dans le ballon pendant 6 heures. Après le dernier cycle, le solvant est transféré à un évaporateur rotatif pour l'élimination des traces de solvant de l'huile extraite. Ce traitement s'effectue à température modérée (40°C). A son issue, on récupère la fraction délipidée.

3- Extraction des Polyphénols

La préparation des extraits polyphénoliques est effectuée selon la méthode de macération mentionnée par Stankovi (2011) avec quelques modifications.

Le matériel végétal précédemment délipidé (5g) a été mélangé avec 50 mL d'éthanol (96%) : solvant polaire (Mandalari et *al.*, 2013). Après agitation des flacons dans un incubateur (1h00 à température ambiante), le mélange est mis à infuser pendant 24 heures, à 4°C, à l'obscurité. Le contenu des flacons a été ensuite filtré sur du papier filtre Wattman n°1 et les résidus sont ré-extraits avec un volume égal de solvant. Après 48 heures, le processus est répété, les surnageants sont réunis puis évaporés sous vide à 40°C en utilisant un évaporateur rotatif (Babbar et *al.*, 2011). Les extraits obtenus sont évaporés sous flux d'azote puis conservés à 4°C.

Des dosages des polyphénols et de leur activité anti-oxydante sont effectués :

4- Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

En milieu alcalin, les polyphénols réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu (F-C) : complexe acide phospho-tungstique/acide phospho-molybdique (couleur jaune) en oxyde de tungstène et de molybdène (couleur bleue), cette coloration, mesurée par spectrophotométrie à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu réactionnel.

Les polyphénols totaux sont déterminés par spectrophotométrie avec la méthode modifiée de Folin Ciocalteu par Singleton, Orthofer et Lamuela-Raventós (1999). 200 µL d'extrait sont dilués à 1 mL avec de l'eau Milli-Q puis mélangés avec 5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu 1:10 et 4 mL de carbonate de sodium (1N). Après 1 h, le mélange a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Shimadzu, UV-1700) à 760 nm contre un tube blanc. Les échantillons sont préparés en 3 exemplaires. Les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique (GAE) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

5- Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode utilisée est celle décrite par Zhishen, Mengcheng et Jianming (1999) et modifiée par Jahanban-Esfahlan et Jamei (2012). Elle est basée sur la réaction des ions aluminium avec les molécules de flavonoïdes dans des conditions basiques.

Le test est réalisé avec une légère modification. Un total de 1,5 mL de l'extrait a été ajouté à 450 µL de NaNO₂ à 5,3 %, 900 µL d'AlCl₃-H₂O à 10 % et 4 mL de NaOH (1 M). Le mélange est agité et laissé au repos pendant 5 minutes avant chaque ajout. Le volume final est complété à 15 ml avec de l'eau Milli-Q. L'absorbance est mesurée à 510 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent catéchine/1g de masse sèche (mg EC/g MS) (Kamtekar et al., 2014) déterminés à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

6- Evaluation de l'activité anti-oxydante

6-1- Activité anti-oxydante Totale

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) en milieu acide grâce au pouvoir antioxydant de l'extrait, ce qui induit la formation du complexe phosphate/Mo de couleur verte (Prieto *et al.*, 1999).

100 µL d'extrait de peaux d'amandes sont mélangés à 1 mL d'une solution composée d'acide sulfurique (0,6 M), de phosphate de sodium (28 mM) et de l'heptamolybdate d'ammonium (4 mM). Le mélange est ensuite incubé au bain-marie, à 95°C pendant 90 minutes. L'absorbance est ensuite mesurée à 695 nm.

L'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gamme de matière sèche (mg EAG/g MS), déterminé à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage standard.

6-2- L'activité inhibitrice du radical DPPH·

Le potentiel anti-radicalaire d'un échantillon se traduit par la mesure de l'activité inhibitrice du radical DPPH· (Scherer et Godoy, 2009).

Le DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant une intense coloration violette et absorbe ainsi dans le domaine visible à la longueur d'onde 517 nm (Binsan *et al.*, 2008 ; Brand-Williams *et al.*, 1995). Le test mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH· (2,2-diphényl-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène sur l'atome d'azote du radical DPPH·, qui se manifeste par une décoloration de la solution qui vire vers le jaune (Gülçin *et al.*, 2006). Cette décoloration explique le pouvoir des extraits de peaux d'amandes à piéger ce radical détecté par un spectrophotomètre UV-visible à 517 nm (λ max DPPH·).

La mesure du pouvoir anti-radicalaire par le piégeage de radical DPPH· est réalisée selon le protocole décrit par Koh *et al.* (2011) avec des modifications. 900 µL de solution éthanolique de DPPH· (60 µM), ayant une absorbance initiale d'environ 0.6 à 517 nm à température ambiante, ont été mélangés à 100 µL de différentes concentrations de chaque extrait à tester (0, 10, 20, 60, 100, 140, 180, 220, 260 et 300 µg/mL). Après agitation, les tubes sont incubés pendant 30 minutes dans l'obscurité, puis les

absorbances des échantillons sont mesurées à $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$. La solution de contrôle est préparée en ajoutant 100 μL d'éthanol à 900 μL de solution de DPPH. Le contrôle positif est représenté par une solution d'antioxydant standard le Trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique), dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

6-3-Essai FRAP

La capacité antioxydante a été mesurée selon Benzie et Strain (1996). Un volume de réactif FRAP, préparé avec 83.3 % d'acétate d'ammonium (300 mM ; pH = 3.6) et 16.7 % du mélange (50:50) du réactif tripyridyltriazine (TPTZ) dans 40 mM de HCl et 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a été chauffé à 37° C pendant 30 minutes. L'absorbance à 593 nm a été enregistrée comme donnée initiale. Ensuite, 1 ml d'extrait d'antioxydant est ajouté et une fois la réaction cinétique terminée, l'absorbance finale est mesurée. Les résultats sont exprimés en μmoles de sulfate de fer heptahydraté (Fe^{2+}) par 100 g d'échantillon humide.

Un volume de 0,2 mL de chacun des extraits à différentes concentrations, 0,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6), et 0,5 mL de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 1%) sont mélangés et incubés à 50°C pendant 20 min, pour réduire le $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ en $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$. La réaction est arrêtée par l'ajout de 0,5 mL d'acide trichloracétique à 10% (p/v), suivi d'une centrifugation à 1000 tr/min pendant 10 min. Enfin, 1 mL de la couche supérieure est mélangé avec un volume égal d'eau distillée et 0,2 mL de chlorure de fer(III) (FeCl_3 ; 0,1 %). La lecture des absorbances se fait contre un blanc sans l'extrait à 700 nm. Dans cette expérience, l'acide ascorbique (AA) est utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions opératoires. Les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées sont tracés. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. La concentration efficace CE50 qui est définie comme la concentration fournissant 0,5 d'absorbance est un indice utilisé pour comparer et exprimer les capacités réductrices des composées phénoliques (Wu et al., 2015).

7- Détermination des composés flavonoïdes par HPLC

L'identification et la quantification des composés phénoliques sont effectuées par chromatographie liquide en utilisant l'extrait initial concentré à l'aide d'un courant d'azote. L'extrait est filtré (Nylon, 0,45 μm , 0,25 mm) avant d'être injecté dans le chromatographe.

Un HPLC de la série 1100 avec un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et un détecteur de fluorescence (FLD), 1200 Series (Agilent Technologies) est utilisé. La phase mobile est préparée avec de l'eau Milli-Q acidifiée avec de l'acide formique à 1% (A = phase aqueuse) et du méthanol (B = phase organique).

Les composés sont séparés selon le gradient suivant, exprimé en pourcentage de A: 0-1 min jusqu'à 95%, 1-25 min jusqu'à 80%, maintenu pendant 5 min, 30-90 min jusqu'à 0%, maintenu pendant 10 min. Entre les deux injections consécutives, une période de 40 min a été nécessaire pour équilibrer la colonne. La colonne utilisée était une colonne Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 4 μm) à un débit constant de 1 mL/min et un volume d'injection de 100 μL . Pour l'identification et la quantification des flavonoïdes, les signaux DAD sont enregistrés aux longueurs d'onde 280 et 360 nm et FLD à 230 et 310 nm, respectivement pour l'excitation et l'émission. L'étalon interne est la daidzéine, une isoflavone présente dans les aliments d'origine végétale (Bolling et al., 2010). Les résultats sont exprimés en mg de composés phénoliques par 100 g de poids frais.

Références

1. Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S., Patil, R.T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44 : 391- 396.
2. Benzie, I.F., Strain, J. (1966). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
3. Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., and Kishimura, H. (2008). Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*. 106 (1) :185-193.
4. Bolling, B.W., Dolnikowski, G., Blumberg, J.B., Oliver, C.Y. (2010) Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*. 122, 819-825.
5. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-*

Wissenschaft Und-Technologie .28, 25-30.

6. **Gülçin İ., Mshvildadze V., Gepdiremen A., Elias R. (2006).** The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β-Dglucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*. 20(2): 130-134.
7. **Jahanban-Esfahlan, A., Jamei, R. (2012).** Properties of biological activity of ten wild almond (*Prunus amygdalus* L.) species. *Turkish Journal of Biology*. 36, 201-209.
8. **Kamtekar, S., Keer, V., Patil, V. (n.d.). (2014).** Estimation of Phenolic content, Flavonoid content, Antioxidant and Alpha amylase Inhibitory Activity of Marketed Polyherbal Formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5.
9. **Koh, P. H., Mokhtar, R. A. M., Iqbal, M. (2011).** Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity. *Human & Experimental Toxicology*. 31(1), 81-91.
10. **Mandalari, G., Faulks, R. M., Bisignano, C., Waldron, K. W., Narbad, A., & Wickham, M. S. J. (2010b).** In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (*Amygdalus communis* L.). *FEMS Microbiology Letters*. 304(2), 116-122.
11. **Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Lo Turco, V., Cacciola, F., Rich, G.T., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., Cross, K.L., Parker, M.L., Waldron, K.W., Wickham, M.S.J. (2010a).** Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 23: 166-174.
12. **Mandalari, G., Arcoraci, T., Martorana, M., Bisignano, C., Rizza, L., Bonina, F. P., Trombetta, D., and Tomaino, A. (2013).** Antioxidant and Photoprotective Effects of Blanch Water, a Byproduct of the Almond Processing Industry. *Molecules*, 18, 12426-12440.
13. **Milbury, P.E., Chen, C.Y., Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B. (2006).** Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 027- 33.
14. **Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric Quantitation of antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific Application to The Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* ; 269 : 337-341.
15. **Scherer, R., et Godoy, H. T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-di-phenyl-1- picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* ; 112 (3) : 654-658.
16. **Stankovi, M. S. (n.d.). (2011).** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. Extracts. *Kragujevac Journal of Science*. 33 : 63-72.
17. **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*. 299, 152-178.
18. **Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., Huang, R. (2015).** Investigation of In vitro and In vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chemistry*. 173:194-202.
19. **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64, 555-559.

Le dernier événement Prometeo aura lieu les 14 et 15 novembre prochains à Tunis.



Êtes-vous prêts?

Informations Générales sur PROMETEO

Bénéficiaire principal

Università degli Studi di Catania (UNICT)

Partenaires

P2: Université de Tunis El Manar (UTM)

P3: Centre Technique des Agrumes (CTA)

P4: Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT)

P5: Agence Nationale de Promotion de la Recherche scientifique (ANPR)

P6: Comune di Palazzolo Acreide (PALAZZOLO)

P7: Centro di Ricerca per l'Innovazione e Diffusione della conoscenza (CERID)

P8: Expergreen S.r.l. (EXPERGREEN)

LE PROJET PROMETEO EN CHIFFRES

Durée	24 mois
Début	29/10/2021
Fin	28/10/2023
N. Partenaires	8
Budget total	1.459.103,08 €
Contribution UE	1.291.659,13 €

LES ACTIVITÉS DU PROJET PROMETEO

No. événements de diffusion et Atelier thématique organisés	5
Nombre de participants	450+
Site-web du projet	1
Comptes social-média	4

CONTACTS

Site du projet: <https://www.prometeo-italietunisie.eu>

Adresse e-mail de référence: info@prometeo-italietunisie.eu

Facebook: <https://www.facebook.com/Prometeo.ItalieTunisie>

Instagram: https://www.instagram.com/prometeo_italietunisie/

Twitter: https://twitter.com/prometeo_ItaTun

Youtube: <https://www.youtube.com/@prometeoitalietunisie4919>



Ce document a été créé et maintenu avec le soutien financier de l'Union Européenne dans le cadre du Programme IEV de Coopération Transfrontalière "Italie Tunisie" 2014-2020. Son contenu relève de la seule responsabilité de CERID et ne reflète pas nécessairement les opinions de l'Union européenne et/ou celles de l'Autorité de Gestion.