



## AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz –Fès – annonce que

Mr : LAAZIZ Adil

Soutiendra : le 18/07/2020 à 10h 30

### Une thèse intitulée :

*Contrôle chimique de la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des espèces d'Aspergillus carbonarius et d'A. niger agrégats isolées du raisin marocain et exploration de l'activité antifongique des huiles essentielles*

### En vue d'obtenir le Doctorat

FD : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologie (MBSB)

Spécialité: Biochimie et Biotechnologie

Devant le jury composé comme suit :

|                              | NOM ET PRENOM            | GRADE      | ETABLISSEMENT                                       |
|------------------------------|--------------------------|------------|---|
| <b>Président</b>             | Pr. BOUKIR Abdellatif    | PES        | FST- Fès  |
| <b>Directeur de thèse</b>    | Pr. BOUSETA Amina        | PES        | Faculté des Sciences<br>Dhar El Mahraz - Fès        |
| <b>Co-directeur de thèse</b> | Pr. HAJJAJ Hassan        | PES        | Faculté des Sciences -UMI- Meknès                   |
| <b>Rapporteurs</b>           | Pr. EL GHACHTOULI Naima  | PES        | FST-Fès   |
|                              | Pr. MOUABAD Abdelfattah  | PES        | FST-UCA-Marrakech                                   |
|                              | Pr. MAZOUZ Hamid         | PES        | Faculté des Sciences -UMI - Meknès                  |
| <b>Membres</b>               | Pr. HAESAERT Geert       | Professeur | Faculty of Bioscience Engineering<br>UGent-Belgique |
|                              | Pr. TAWFIKI HAJJI Khalid | PES        | Faculté des Sciences<br>Dhar El Mahraz – Fès        |

## Résumé :

La contamination des produits agricoles par les champignons phytopathogènes constitue une menace majeure pour le secteur agroalimentaire à l'échelle mondiale. En particulier, les espèces *d'Aspergillus* qui, outre leur capacité à provoquer la pourriture, menacent la santé humaine et animale notamment par la production des mycotoxines. Parmi ces mycotoxines, l'ochratoxine A (OTA), métabolite secondaire de certaines espèces *d'Aspergillus* et de *Penicillium*, est produite sur une large gamme de denrées alimentaires et de produits agricoles. Sa persistance dans les aliments après les étapes de transformation et de stérilisation provoque plusieurs effets délétères comme les effets néphrotoxiques, cancérigènes et tératogènes. Dans ce cadre, l'évaluation de l'effet combiné de trois fongicides (azoxystrobine, hexaconazole et pyriméthanil) et de l'activité de l'eau (0.90 ; 0.95 et 0.99  $a_w$ ) sur la croissance radiale et la production de l'OTA par cinq souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger*, isolées à partir du raisin, a été réalisée. L'effet *in vitro* et *in vivo* de trois huiles essentielles (HE) sur la croissance radiale et la production de l'OTA par treize souches *d'A. carbonarius* et *A. niger* agrégats ainsi que l'effet de ces huiles sur l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA chez deux souches *d'A. carbonarius* et *A. niger* ont également été étudiés. Les résultats de l'effet des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique ont montré que tous les fongicides testés réduisent la croissance fongique mais cette réduction dépend de manière très significative ( $p=0.000$ ) de la souche, de l'activité de l'eau, du fongicide et de la dose appliquée. L'interaction des fongicides et des activités de l'eau affectait aussi bien les phases de latence que les taux de croissance radiale de toutes les souches testées. Le pyriméthanil et l'hexaconazole se sont avérés les plus efficaces, quelles que soient l'activité de l'eau et la dose appliquée avec une inhibition totale de la croissance des cinq souches, à l'exception de la dose la plus faible d'hexaconazole ( $0.01 \times DR$ ) à 0.99  $a_w$  où une faible croissance a été notée pour *A. niger* (2.67 mm/jour). La réduction de la croissance fongique pour les trois fongicides était accompagnée par une réduction de la production de l'OTA. L'étude de l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles du romarin, du clou de girofle et du thym sur le contrôle de la croissance fongique et la production d'OTA par *A. carbonarius* et *A. niger* agrégats a révélé que l'activité antifongique de l'huiles essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) était faible avec des taux d'inhibition qui ne dépassent pas 41.20% à 200  $\mu L/L$  d'HE. A l'inverse, les huiles essentielles du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et du thym (*Thymus satureioides*) ont une activité antifongique importante avec des taux d'inhibition qui varient selon la souche et la dose de l'HE et atteignent 100% à 200  $\mu L/L$ . Cependant, cette réduction de croissance était accompagnée dans certains cas par une stimulation de la biosynthèse de l'OTA. En effet, l'étude de l'effet des HE du clou de girofle et du thym sur les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA (PKS, NRPS et HAL) chez *A. carbonarius* et *A. niger* a révélé que les gènes étudiés ont été surexprimé dans la majorité des traitements. Cette surexpression peut expliquer la stimulation de l'OTA. L'étude *in vivo* de l'HE du thym et du clou de girofle a montré que ces huiles étaient capables d'une part, de réduire le pourcentage de contamination (RGB%) chez les raisins infectés, et d'autre part, de préserver l'indice d'anthocyane (AriIdx) à la dose la plus élevée (2000  $\mu L/L$ ).

**Mots clés :** Ochratoxine A, fongicides, activité de l'eau, huile essentielle ; expression des gènes ; *Aspergillus*.

# Chemical control of fungal growth and ochratoxin A production by species of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger aggregates* isolated from Moroccan grape and exploration of the antifungal activity of essential oils

## Abstract:

Contamination of agricultural products with phytopathogenic fungi is a major threat to the global food industry. In addition to their ability to cause rot, species of *Aspergillus* threaten human and animal health, in particular through mycotoxins production. Ochratoxin A (OTA), a secondary metabolite of certain species of *Aspergillus* and *Penicillium*, is a mycotoxin produced on a wide range of food and agricultural products. Its persistence in food after transformation and sterilization causes several deleterious effects such as nephrotoxic, carcinogenic and teratogenic effects. In this context, the evaluation of the combined effect of three fungicides (azoxystrobin, hexaconazole and pyrimethanil) and water activity (0.90; 0.95 and 0.99  $a_w$ ) on radial growth and OTA production by five strains of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger*, isolated from grapes, was carried out. The *in vitro* and *in vivo* effects of essential oils (EO) on the radial growth and OTA production by thirteen strains of *A. carbonarius* and *A. niger aggregates* as well as their effect on the expression of genes responsible for the OTA biosynthesis in two strains of *A. carbonarius* and *A. niger* have also been studied. The results showed that all the fungicides tested reduced fungal growth but this reduction depended very significantly ( $p = 0.000$ ) on the strain, the water activity, the fungicide and the applied concentration. The interaction of fungicides and water activities affected both the lag phases and the radial growth rates of all strains tested. Pyrimethanil and hexaconazole were found to be the most effective, regardless of water activity and the applied dose with complete inhibition of growth of the five strains, except for the lowest dose of hexaconazole ( $0.01 \times RD$ ) at 0.99  $a_w$  where weak growth was noted for *A. niger* (2.67 mm/day). The reduction in fungal growth for the three fungicides was accompanied by a reduction in OTA production. The *in vitro* and *in vivo* study of the effectiveness of rosemary, clove and thyme essential oils on the fungal growth and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger aggregates* revealed that the antifungal activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) was low, with a maximum inhibition rates of 41.20% at 200  $\mu\text{L/L}$  of EO. Conversely, the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and thyme (*Thymus satureioides*) have a significant antifungal activity, inhibition rates were varied according to the strain and the EO concentration and reach 100% at 200  $\mu\text{L/L}$ . However, this reduction in growth was accompanied in some cases by stimulation of the OTA biosynthesis. Indeed, the study of the effect of the EO of clove and thyme on the expression levels of genes involved in the biosynthesis of OTA (PKS, NRPS and HAL) in *A. carbonarius* and *A. niger* revealed that the genes studied were overexpressed in the most of treatments. This overexpression may explain the OTA stimulation. The *in vivo* study of the thyme and clove EOs has shown that these oils are able to reduce the percentage of contamination (RGB%) in infected grapes, and preserve the anthocyanin index (AriIdx) at the highest dose of EO (2000  $\mu\text{L/L}$ ).

**Keywords:** Ochratoxin A, fungicides, water activity, essential oil; gene expression; *Aspergillus*.