



AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

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

Mme (elle) **MOUSSAID Fatima ZAHRAE**

Soutiendra : le Samedi 20/05/2023 à 10H00

Lieu : Centre des Etudes Doctorales - USMBA – Amphi 2

Une thèse intitulée :

Recherche de nouveaux antifongiques biologiques pour lutter contre les champignons nuisibles : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Candida albicans*

En vue d'obtenir le **Doctorat**

FD : **Molécules Bioactives Santé et Biotechnologie**

Spécialité : **Microbiologie et Biologie Moléculaire**

Devant le jury composé comme suit :

Nom et prénom	Etablissement	Grade	Qualité
Pr EL HASSOUNI Mohammed	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Président
Pr BENAMAR Saad	Ecole Normale Supérieure, Fès	PES	Rapporteur & Examineur
Pr LAHLALI Rachid	Ecole Nationale d'Agriculture, Meknès	PH	Rapporteur & Examineur
Pr RIHANI Mohammed	Faculté des Sciences, El Jadida	PES	Rapporteur & Examineur
Pr ABDELLAOUI Abdelfattah	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Examineur
Pr BELHAJ Abdelhaq	Faculté des Sciences, Meknès	PES	Examineur
Pr TALEB Mustapha	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Examineur
Pr IRAQI HOUSSEINI Abdel Ilah	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	PES	Directeur de thèse



Résumé :

La recherche de nouveaux fongicides d'origine biologique constitue à nos jours, l'une des priorités les plus encouragées pour protéger la santé humaine et les produits agricoles contre les nuisances d'origine fongique. Le but de cette thèse est de rechercher des substances antifongiques d'origine microbienne (champignons ou bactéries) et végétale (extraits des plantes et huiles essentielles). Durant notre projet de recherche, nous nous sommes intéressés à la lutte contre les champignons : *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Fusarium oxysporum* connus par leur pouvoir infectieux et avariant.

Dans la première phase de recherche, des isollements échelonnés dans le temps (tous les 30 jours) de bactéries et de champignons ont été effectués à partir des déchets verts, et des fientes de volaille en décomposition dans un sol agricole rouge. Ainsi 73 moisissures et 71 levures ont été isolées puis purifiées. Ces isolats ont été confrontés sur milieu à l'extrait de malt (1,5%) gélosé (1,5%), à *A. alternata*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *C. albicans* et *F. oxysporum*. Ces confrontations nous ont permis de sélectionner un antagoniste fongique isolé à partir des feuilles mortes de grenadier. Il a montré une importante inhibition (66,6%) contre *A. alternata*. Cet antagoniste a été identifié comme *A. nidulans* MW732187. Le filtrat de sa culture en milieu nutritif liquide (extrait de malt 1,5%) a révélé une activité fongicide de l'ordre de $50,97 \pm 0,85$ contre *A. alternata*. Ce filtrat fongicide présente l'avantage d'être d'origine biologique, facile à obtenir, d'utilisation simple. Son application *in vivo* sur la tomate en post récolte, a permis la prolongation de 10 jours, la durée de conservation de ce fruit. Ce filtrat se présente donc comme un fongicide de choix pour prévenir les avaries des produits agricole en post culture. Le traitement du papier peint a permis de constater une importante inhibition de la prolifération d'*A. alternata*. Ceci encourage son utilisation comme traitement de prévention contre les allergènes fongiques.

Le criblage chimique du filtrat de culture liquide bio-fongicide d'*A. nidulans* a révélé la présence de phénols, de polyphénols, de flavonoïdes et de saponines. Les tests antifongiques des extrais hexaniques, dichlorométhaniques, et ethyle-acétatiques ont été réalisés. C'est l'extrait ethyle-acétatiques qui a montré la meilleure activité, avec un taux d'inhibition fongique (%IF) de $81,25 \pm 1,5$. Cet extrait a montré une teneur de composés phénoliques totaux de 16,84 µg/mL en GAE, et une teneur totale en flavonoïdes de 0,055 mg/ml en QE.

Dans la deuxième phase de notre projet de recherche, 110 bactéries isolées, ont été testées sur les champignons pathogènes retenus. Ceci nous a permis de sélectionner 10 bactéries antagonistes qui comportent trois espèces ; *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus siamensis*. Ces bactéries se sont révélées capables de produire des composés bioactifs dans les filtrats des cultures liquides qui ont montré des activités antifongiques contre *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. alternata*, *C. albicans* et *F. oxysporum*.

Enfin, nous avons testé une vingtaine de plantes aromatiques et médicinales (extraits végétaux et HEs) sur les pathogènes *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. alternata* et *F. oxysporum* et nous avons déduit que les HEs de *S. aromaticum*, *L. nobilis*, *R. officinalis*, *C. cyminum*, *T. vulgaris* et *C. burmanni*, peuvent constituer de véritables alternatives des produits fongicides conventionnels.

Les résultats des recherches, obtenus au cours de cette thèse, et notre contribution à d'autres recherches, ont été valorisés par 33 publications : 3 articles en premier auteur et 10 en coauteur, dans des journaux internationaux ; 12 communications orales et 07 affichées, dans des colloques internationaux ; et un brevet international publié sous le numéro WO2022216147 (A2).

Mots clés : Microbiologie ; Biologie moléculaire ; Substances antifongiques ; lutte microbiologique ; *Aspergillus nidulans* ; *Alternaria alternata* ; *Aspergillus fumigatus* ; *Aspergillus flavus* ; *Fusarium oxysporum* ; *Candida albicans* ; Huiles essentielles.



Search for new biological antifungals to fight harmful fungi: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Candida albicans*

Abstract:

The search for new fungicides of biological origin is nowadays one of the most encouraged priorities to protect human health and agricultural products against nuisances of fungal origin. The aim of this thesis is to research antifungal substances of microbial (fungi or bacteria) and plant (plant extracts and essential oils) origin. During our research project, we were interested in the fight against fungi: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* known for their infectious and damaging power.

In the first phase of research, time-phased isolations (every 30 days) of bacteria and fungi were made from green waste and decomposing poultry droppings in red agricultural soil. Thus 73 molds and 71 yeasts were isolated and then purified. These isolates were confronted on medium with malt extract (1.5%) agar (1.5%), *A. alternata*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *C. albicans* and *F. oxysporum*. These comparisons allowed us to select a fungal antagonist isolated from dead pomegranate leaves. It showed significant inhibition (66.6%) against *A. alternata*. This antagonist has been identified as *A. nidulans* MW732187. The filtrate of its culture in liquid nutrient medium (1.5% malt extract) revealed a fungicidal activity of around 50.97 ± 0.85 against *A. alternata*. This fungicidal filtrate has the advantage of being of biological origin, easy to obtain and simple to use. Its application in vivo on the tomato in post harvest, allowed the extension of 10 days, the shelf life of this fruit. This filtrate is therefore presented as a fungicide of choice to prevent damage to agricultural products in post-culture. The treatment of the wallpaper made it possible to observe a significant inhibition of the proliferation of *A. alternata*. This encourages its use as a preventative treatment against fungal allergens.

Chemical screening of *A. nidulans* bio-fungicidal liquid culture filtrate revealed the presence of phenols, polyphenols, flavonoids and saponins. Antifungal tests of hexane, dichloromethane, and ethyl acetic extracts were carried out. It is the ethyl-acetic extract which showed the best activity, with a fungal inhibition rate (%IF) of 81.25 ± 1.5 . This extract showed a content of total phenolic compounds of $16.84 \mu\text{g/mL}$ in GAE, and a content of total flavonoids of 0.055 mg/ml in QE.

In the second phase of our research project, 110 isolated bacteria were tested on the selected pathogenic fungi. This allowed us to select 10 antagonistic bacteria comprising three species; *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus siamensis*. These bacteria were shown to be able to produce bioactive compounds in liquid culture filtrates that showed antifungal activities against *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. alternata*, *C. albicans* and *F. oxysporum*.

Finally, we tested about twenty aromatic and medicinal plants (plant extracts and HEs) on the pathogens *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. alternata* and *F. oxysporum* and we deduced that the HEs of *S. aromaticum*, *L. nobilis*, *R. officinalis*, *C. cyminum*, *T. vulgaris* and *C. burmanni*, can constitute real alternatives to conventional fungicide products.

The research results obtained during this thesis, and our contribution to other research, have been highlighted by 33 publications: 3 articles as first author and 10 as co-author, in international journals; 12 oral communications and 07 posters, in international conferences; and an international patent published under the number WO2022216147 (A2).

Keywords: Microbiology; Molecular biology ; Antifungal substances; microbiological control; *Aspergillus nidulans*; *Alternaria alternata*; *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus flavus*; *Fusarium oxysporum*; *Candida albicans*; Essential oils.